KONSTITUTION DES PROCUMBIDS
UND EIN BEITRAG ZUR KENNTNIS WEITERER INHALTSSTOFFE
AUS DER WURZEL VON HARPAGOPHYTUM PROCUMBENS DC

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Hans-Eberhard Hammer
aus Stettin

März 1967

KONSTITUTION DES PROCUMBIDS UND EIN BEITRAG ZUR KENNTNIS WEITERER INHALTSSTOFFE AUS DER WURZEL VON HARPAGOPHYTUM PROCUMBENS DC

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Hans-Eberhard Hammer
aus Stettin

März 1967

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

Referent: Professor Dr. P. Tunmann
Korreferent: Professor Dr. C.H. Brieskorn

Eingereicht am : 20. März 1967

Tag der mündlichen Prüfung : 24. Mai 1967

Promotion 9. Juni 1967

MEINEN ELTERN

IN DANKBARKEIT

Für die Anregung dieser Arbeit, zahlreiche wertvolle Hinweise und das mir jederzeit entgegengebrachte Verständnis sage ich meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. P. Tunmann herzlichen Dank.

Zu großem Dank bin ich auch Herrn Professor Dr. C.H. Brieskorn für die stetige Förderung und Unterstützung dieser Arbeit verpflichtet.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
A	Allgemeiner Teil	1
I	Einleitung	1
II	Aufarbeitung der Droge	2
III	Zur Konstitution des Procumbids	4
1.	Isolierung	4
2.	Konstitution	5
2.1	Reaktionen an der Doppelbindung	8
2.1.1	Katalytische Hydrierung	8
2.1.2	Ozonspaltung	9
2.2	Anzahl und Anordnung der Hydroxylgruppen	13
2.2.1	Acetylierung	13
2.2.2	Perjodat-Oxydation	14
2.3	Das Aglucon	16
2.3.1	Isolierung	16
2.3.2	Hydrierungsprodukte	16
2.3.3	Zur Struktur eines Lactons	17
2.4	Nachweis der Glucose	19
2.5	Kernresonanzspektren	19
2.5.1	Zuordnung der Signale	19
2.5.2	Sterische Verhältnisse	25
2.5.3	Einfluß struktureller Unterschiede auf die Kernresonanzspektren von Iridoiden	27
IV	Inhaltsstoffe des Petrolätherextraktes	30
1.	Die Kohlenwasserstoffe	31
1.1	Gesättigte Kohlenwasserstoffe	31
1.2	Ungesättigte und höher verzweigte Kohlenwasserstoffe	34
1.3	Quantitative Zusammensetzung des Kohlenwasserstoffgemisches	35
2.	Zusammensetzung des Fettes	36
3.	Zusammensetzung des Wachses	37
4.	Bestandteile des Steringemisches	38
4.1	Trennung der Sterinacetate auf Silbernitrat-Kieselgel-Schichten	39
4.2	Gaschromatographische Analyse	40

B Zusammenfassung 42

C Experimenteller Teil 44

I Allgemeine Angaben 44

II Extraktion der Wurzeldroge 45

III Procumbid 46

1. Isolierung 46
1.1 Fraktionierung der Wasserphase an Kohle-Celite 46
1.2 Reinigung der Rohfraktion an Zellulosepulver 47

2. Reaktionen des Procumbids 47
2.1 Analytische Eigenschaften 47
2.2 Reaktionen an der Doppelbindung 48
2.2.1 Katalytische Hydrierung 48
2.2.2 Ozonspaltung 48

2.3 Reaktionen der Hydroxylgruppen 50
2.3.1 Acetylderivate 50
2.3.2 Perjodat-Oxydation 51

2.4 Reaktionen des Aglucons 52
2.4.1 Isolierung 52
2.4.2 Hydrierungsprodukte 53
2.4.3 Darstellung und Reaktionen des Lactons 54

IV Inhaltsstoffe des Petrolätherextraktes 56

1. Auftrennung 56

2. Untersuchung des Kohlenwasserstoffgemisches 56
2.1 Abtrennung eines n-Alkan-Gemisches durch Kristallisation 56
2.2 Isolierung von Squalen 56
2.2.1 Bildung eines Harnstoffadduktes 56
2.2.2 Abtrennung des Squalens als Thioharnstoffaddukt 57
2.2.3 Versuch zur Darstellung des Squalen-hexahydrochlorids 57

2.3 Gaschromatographische Analyse der Kohlenwasserstoffe 57

3. Fett- und Wachs-Fettsäuren 59
3.1 Darstellung der Fettsäuremethylester 59
3.2 Gaschromatographie der Fettsäuremethylester 59

4 Untersuchung der Sterine 59
4.1 Isolieren des Steringemisches 59
4.2 Nachweis-Reaktionen 60
4.3 Acetylierung der Sterine 60
4.4 Darstellung eines Bromaddukts 60
4.5 Dünnschichtchromatographie der Sterinacetate auf Silbernitrat-Kieselgel 60
4.6 Gaschromatographie der Sterine 61
4.7 Quantitative Bestimmung der Sterine 61

D Literaturverzeichnis 62

A ALLGEMEINER TEIL

I EINLEITUNG

Harpagophytum procumbens DC ist eine in Südafrika weit verbreitete Pedaliacee (1).

Ihre großen Wurzeln, die pharmakognostisch als Tubera (2) zu bezeichnen sind, werden von den Eingeborenen und ihren Medizinmännern bei den verschiedensten Beschwerden angewendet. Die zerstoßene frische Wurzel dient in Heilsalben zur Behandlung von Hauterkrankungen (Entzündungen, Geschwüre, Hautkrebs), die getrocknete Wurzel in Pulverform zur Schmerzlinderung (Geburt, Rheuma, Neuralgien) und als Infus zur Fieber- und Blutstillung (3).

Ähnlich umfassend ist auch die Indikation der in den letzten Jahren in Westeuropa und Nordamerika immer häufiger angepriesenen und bei uns unter dem Namen "Harpago-Tee" angebotenen Wurzeldroge: so sollen Stoffwechselerkrankungen, Arthritis, Diabetes, Allergien, ja selbst Alterserscheinungen günstig beeinflußt werden.

Die pharmakologische Prüfung ergab bisher lediglich eine gewisse antirheumatische Wirkung (4) bei einer für den menschlichen Organismus geringen Toxizität (5).

Bei der Prüfung der Droge auf ihre Inhaltsstoffe hatten P. TUNMANN und R. LUX (6) die Glukoside Harpagid und dessen Zimtsäureester Harpagosid und P. TUNMANN und N. STIERSTORFER (7) neben verschiedenen Kohlenhydraten ein weiteres Glukosid auffinden können.

Nachdem die funktionellen Gruppen dieser Glukoside bereits nachgewiesen worden waren, sollte es ursprünglich Aufgabe dieser Arbeit sein, die Struktur des Harpagids und damit auch des Harpagosids zu ermitteln.

Vor dem Abschluß dieser Untersuchungen war es jedoch H. LICHTI und A. v. WARTBURG (8) gelungen, die Konstitution dieser Glukoside aufzuklären.

Im Rahmen meiner Arbeit sollte daher das von N. STIERSTORFER aufgefundene Glukosid untersucht werden, für das der Name Procumbid vorgeschlagen worden war (9).

Außerdem wurde der Petrolätherextrakt auf seine Inhaltsstoffe geprüft.

II AUFARBEITUNG DER DROGE

Die Aufarbeitung der Droge erfolgte im wesentlichen nach den bei LUX (10) und STIERSTORFER (11) angegebenen Vorschriften.

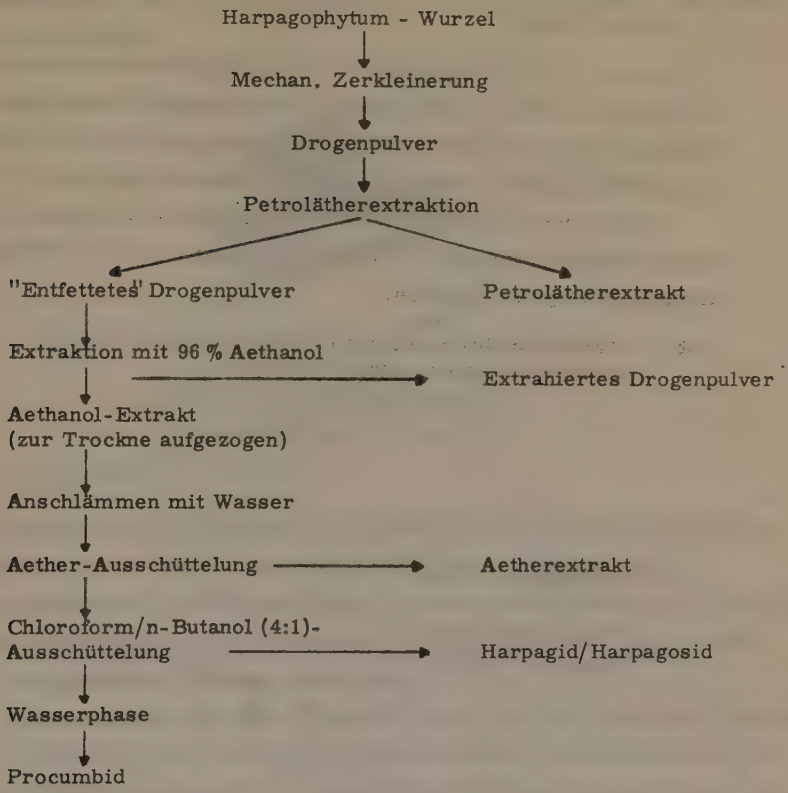
Nach der Entfettung der Droge mit Petroläther (Petrolätherrückstand 0,2 %, bezogen auf das Trockengewicht der Droge), wurde erschöpfend mit 96%igem Aethanol extrahiert.

Der Alkohol-Auszug ergab, vorsichtig zur Trockne gebracht, ein bitteres, gelbbraunes, aromatisch riechendes und sehr hygroskopisches Pulver, das 8,3 % des Drogengewichts entsprach.

Durch Ausschütteln mit Aether wurde die wässrige Anschlämmung des Extraktes von den schwer petrolätherlöslichen Lipoid-Anteilen befreit. Der dabei erhaltene Trockenrückstand betrug 0,18 % des Drogengewichts.

Harpagid, Harpagosid und ein Teil der Kohlenhydrate wurden mit n-Butanol/Chloroform (4:1) ausgeschüttelt. Es konnten so 37,7 % der Begleitstoffe des Aethanolextraktes abgetrennt werden.

Schematische Darstellung der Aufarbeitung der Droge



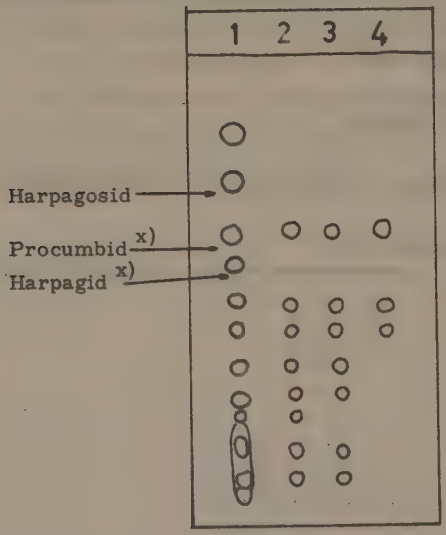
III ZUR KONSTITUTION DES PROCUMBIDS

1. Isolierung

Die bei der Aufarbeitung der Droge zurückbleibende Wasserphase (s. Übersicht) enthielt neben Procumbid überwiegend Kohlenhydrate. Der Trockenrückstand entsprach 48, 8 % des Aethanolextraktes und wurde an Kohle/Celite (12) mit Wasser/Aethanol-Gemischen fraktioniert.

Doch auch die hierbei erhaltenen Rohfraktionen waren noch stark durch Kohlenhydrate verunreinigt. Diese konnten durch Verteilung an Zellulosepulver abgetrennt werden.

Abb. 1 Dünnschichtchromatogramm des Aethanolextraktes und seiner procumbidhaltigen Fraktionen



Fließmittel: n-Butanol/Eisessig/Wasser 4 : 1 : 2
Sprühreagenz: Antimon(III)chlorid (Chloroform)

1) Aethanol-Extrakt
2) Wasserphase
3) Procumbid-Rohfraktion (Kohle/Celite)
4) Procumbid-Fraktion (Zellulose)

---

x) Procumbid fluoresziert hellblau, Harpagid gelb

Die fast einheitlichen und nur noch leicht bräunlich gefärbten Procumbid-Fraktionen der Zellulose-Säule ließen sich aus essigesterhaltigem Aethanol kristallisieren. Durch Umkristallisation aus reinem Aethanol wurden weiße Kristalle erhalten.

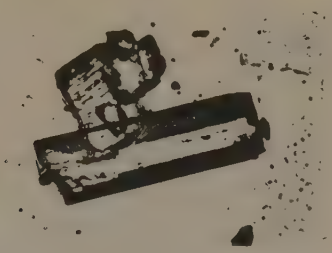


Abb. 2 Kristalle des Procumbids
Vergrößerung 1 : 100

2. Konstitution

Die gewonnene Substanz zeigt dieselben physikalischen und chemischen Eigenschaften wie die von STIERSTORFER isolierte Verbindung.

Sie schmilzt bei 212^0C und ist sehr gut in Wasser, schlechter in Aethanol, kaum in Essigester und in Chloroform und Aether praktisch nicht löslich.

Die spezifische Drehung beträgt $[\alpha]_D^{20} - 81^\circ$.

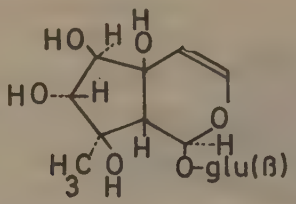
Procumbid ist ein Glukosid, das sich sehr rasch mit verdünnter Mineralsäure zu einem braunschwarzen, wasser- und ätherunlöslichen Produkt zersetzt. Auch nach besonders schonend vorgenommener Hydrolyse konnte nur wenig reines Aglucon erhalten werden.

Wegen der leichten Zersetzlichkeit des Aglukons wurden die Arbeiten zur Ermittlung der Struktur vor allem am beständigeren Glukosid durchgeführt. Aber auch aus diesem bildeten sich bei allen Umsetzungen viele Nebenprodukte, die die Untersuchungen zur Konstitutionsaufklärung sehr erschwerten, zumal nur wenig Substanz zur Verfügung stand.

Das von STIERSTORFER kryoskopisch ermittelte Molekulargewicht mit dem Wert 331 ist aufgrund der osmometrischen Bestimmung auf 380 zu ändern. Die sich hieraus ergebende Summenformel $C_{15}H_{24}O_{11}$ stimmt mit dem

Ergebnis der Elementar-Analyse überein.

Aus diesen Angaben und den physikalischen und chemischen Befunden ergibt sich folgende Struktur:



Procumbid gehört damit wie das bereits aufgeklärte Harpagid zur Gruppe der Iridoide (13).

Die Verbindung entfärbt Brom- und alkalische Kaliumpermanganatlösung, was auf die Anwesenheit einer Doppelbindung hinweist.

Allerdings spricht die Substanz nicht auf Tetranitromethan an.

Nach KUHN/ROTH enthält der Stoff 1 C-Methylgruppe.

Trotz des verhältnismäßig großen Glukose-Restes, der einen wesentlichen Teil des IR-Spektrums beansprucht, können in diesem (Abb. 3) noch wichtige funktionelle Gruppen des Aglucons erkannt werden.

Typisch für stark assoziierte Hydroxylgruppen ist die breite Bande im Bereich 3350 cm^{-1}. Die Absorptionen bei 1420 und 1148 cm^{-1} deuten auf eine oder mehrere tertiäre Hydroxylgruppen hin.

Bei 3300 cm^{-1} liegt die stark ausgeprägte CH-Valenzschwingungsbande.

Das Vorliegen einer C-Methylgruppe wird durch die bei 1370 cm^{-1} erscheinende symmetrische und die als Schulter bei 1450 cm^{-1} auftretende asymmetrische Deformationsschwingung bestätigt.

Sehr ausgeprägt ist die Bande bei 1660 cm^{-1}, etwas schwächer die bei 1625 cm^{-1}. Beide sprechen für eine Enoläthergruppierung.

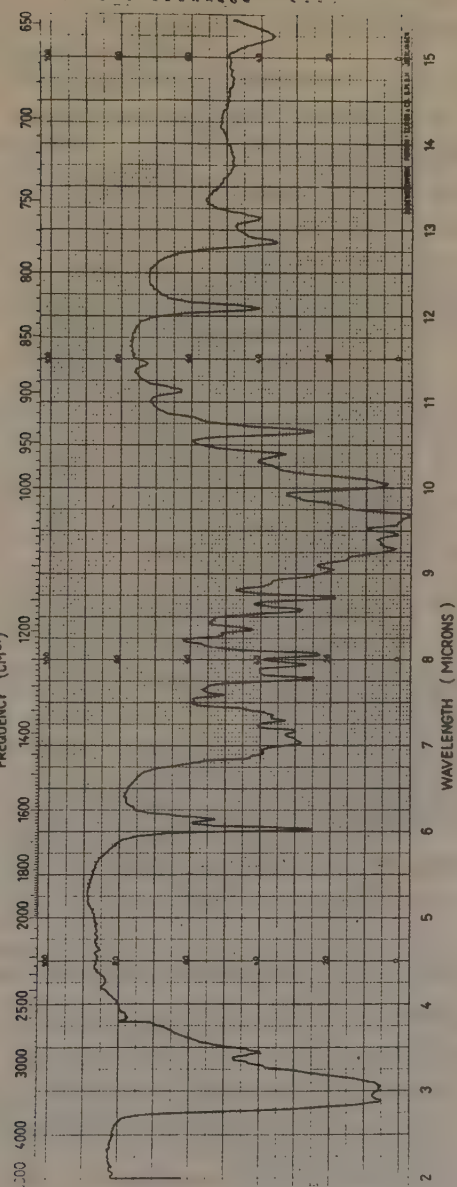


Abb. 3 IR - Spektrum des Procumbids.

2.1 Reaktionen an der Doppelbindung

2.1.1 Katalytische Hydrierung

Bei der katalytischen Hydrierung des Glukosids mit 10%iger Palladium/Aktivkohle wird 1 Mol Wasserstoff aufgenommen, was für die Anwesenheit einer Doppelbindung spricht.

Im IR-Spektrum der Dihydroverbindung fehlen die beiden Peaks bei 1625 und 1660 cm^{-1}

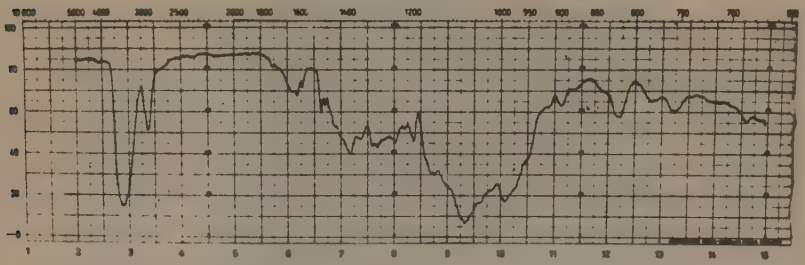


Abb. 4 IR-Spektrum des Dihydroprocumbids

Schon nach kurzer Einwirkung des vorhydrierten Katalysators war im Hydrierungsansatz eine weitere Substanz nachzuweisen. Diese reicherte sich im Laufe der Hydrierung an und konnte durch präparative Schichtchromatographie abgetrennt werden.

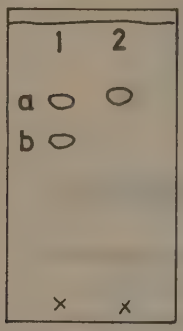
Trotz des fast gleichen Rf-Wertes der Flecken des Procumbids und des Dihydroprocumbids (Abb. 5) – auch in n-Butanol/Eisessig/Wasser 4 : 1 : 2 – unterscheiden sich diese deutlich durch die verschiedene Fluoreszenz im langwelligen UV nach der Behandlung mit Carr-Price-Reagenz. Procumbid weist hellblaue, Dihydroprocumbid dagegen schwach gelbliche Fluoreszenz auf.

Das Nebenprodukt zeigt wieder intensiv hellblaue Fluoreszenz bei allerdings völlig verschiedenem Rf-Wert. Die Verbindung spricht schon in der Kälte auf 1/2 konz. Schwefelsäure unter Ausbildung einer blauvioletten Färbung an. Brom- und alkalische Kaliumpermanganatlösung werden entfärbt, im Gegensatz zum Procumbid gibt die Substanz jedoch mit Tetranitromethan eine deutlich erkennbare Gelbfärbung.

Die veränderte Doppelbindungsbande im IR-Spektrum des acetylierten Nebenprodukts (Abb. 11) läßt auf die Anwesenheit einer weiteren, anders angeordneten Doppelbindung schließen.

Abb. 5

Dünnschichtchromatogramm des Hydrierungsansatzes



Fließmittel: n-Butanol/Aceton 5 : 4
Sprühreagenz: Antimon(III)-chlorid (Chloroform)
1) Hydrierungsansatz
a) Dihydroprocumbid
b) Nebenprodukt
2) Procumbid

Offenbar bilden sich bei der katalytischen Wasserstoffanlagerung infolge Dehydratisierung Doppelbindungen aus, wie dies auch bei anderen Iridoiden [z.B. Monotropein (30)] der Fall ist. Nach längerer Hydrierung wird daher ein erhöhter Wasserstoffverbrauch festgestellt.

2.1.2 Ozonspaltung

Zur näheren Charakterisierung der Doppelbindung wurde das Ozonid des Procumbidacetats dargestellt und dieses durch katalytische Hydrierung an Palladium/Aktivkohle gespalten.

Als Spaltprodukte entstanden Formaldehyd und Ameisensäure.

Der Nachweis des Formaldehyds erfolgte

1. über das mit Chromotropsäure/Schwefelsäure gebildete rotviolette Farbprodukt, dessen Absorptionsspektrum dieselben Maxima zeigte, wie eine mit Formaldehyd bereitete Vergleichsprobe (Abb. 6),
2. mit fuchsinschwefliger Säure sowie
3. gaschromatographisch (Abb. 7).

Die Ameisensäure wurde papierchromatographisch als Hydroxamsäure (14) identifiziert.

Die ausschließliche Bildung von C 1-Carbonylverbindungen beweist das Vorliegen der Enoläthergruppierung, d.h. die unmittelbare Nachbarschaft eines Äthersauerstoffs zur Doppelbindung.

Die erfolgte Spaltung der Doppelbindung wird durch das IR-Spektrum des Spaltproduktes (Abb. 8) bewiesen: die hier auftretende CH-Schwingungsbande bei 2800 cm^{-1} ist einer Aldehyd-Gruppierung zuzuordnen.

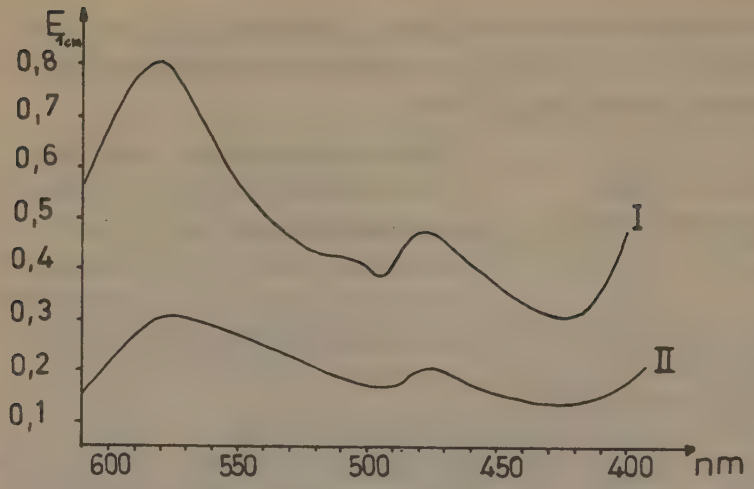


Abb. 6 Absorptionsspektrum des mit Chromotropsäure/Schwefelsäure entstehenden Farbprodukts
I Formaldehydlösung
II Analysenlösung

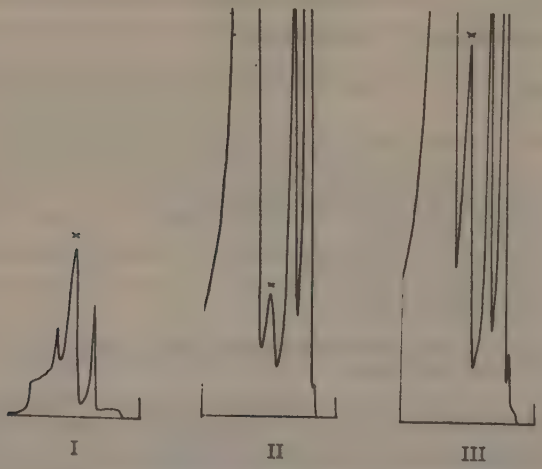


Abb. 7 Gaschromatogramme zum Nachweis des Formaldehyds (Bedingungen s. Experimenteller Teil)
I Formaldehydlösung
II Analysenlösung
III Mischchromatogramm

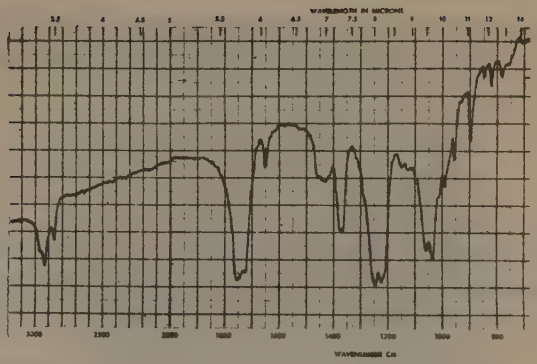
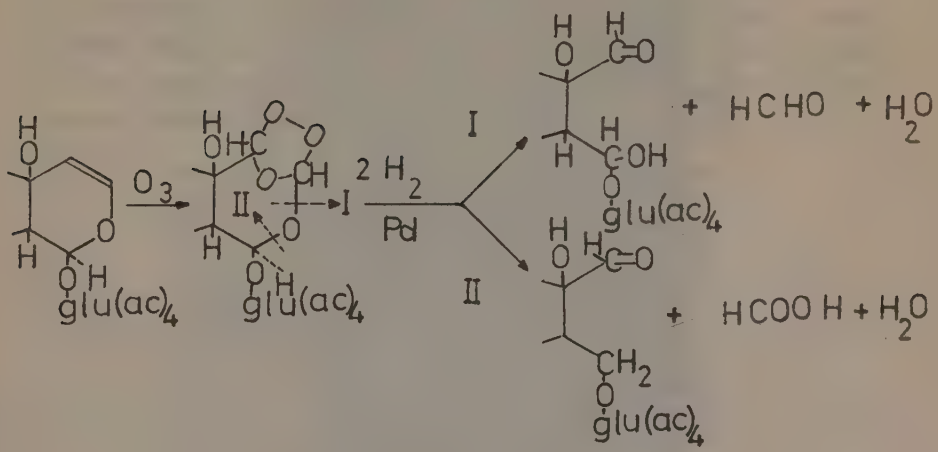


Abb. 8 IR-Spektrum des gespaltenen Ozonids

Die Spaltung des Ozonids erfolgt aufgrund der Reaktionsprodukte in zwei Richtungen:



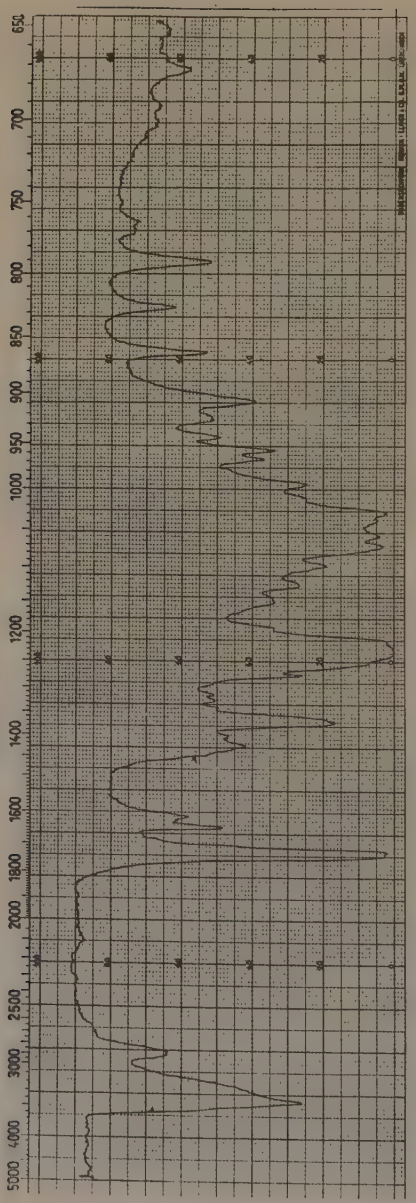


Abb. 9 IR - Spektrum des Procumbidpentaacetats

Da eine genauere, auch quantitative Untersuchung der Spaltprodukte wegen der geringen Substanzmenge nicht möglich war, konnte nicht entschieden werden, nach welchem der beiden Wege die Spaltung bevorzugt verlief.

2.2 Anzahl und Anordnung der Hydroxylgruppen

2.2.1 Acetylierung

Zur Ermittlung der Anzahl der Hydroxylgruppen wurde Procumbid acetyliert. Dabei wurden je nach den Reaktionsbedingungen verschiedene Acetate erhalten.

Beim Acetylieren mit Essigsäureanhydrid in absolutem Pyridin bei 35°C entstand ein Pentaacetat (IR-Spektrum Abb. 9). Es kristallisierte nadelförmig, schmolz bei 137-138°C und zeigte die spezifische Drehung $[\alpha]_D^{20}$ - 72,5°.

Nach wiederholter Acetylierung unter den gleichen Bedingungen konnte über das Hexaacetat, das nicht einheitlich zu erhalten war, das Heptaacetat dargestellt werden. Dieses kristallisierte ebenfalls in Nadeln, zeigte den Schmelzpunkt 132 - 133°C und die spezifische Drehung $[\alpha]_D^{20}$ - 68°.

Da das IR-Spektrum des Heptaacetats noch eine scharfe Hydroxylbande aufweist (Abb. 10) muß das Glukosid mindestens 8 Hydroxylgruppen enthalten.

Die Lage dieser Bande im IR-Spektrum bei 3350 cm^{-1} spricht für eine tertiäre Anordnung der nicht acetylierbaren Hydroxylgruppe.

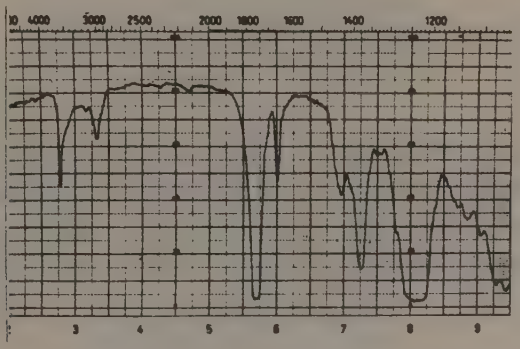


Abb. 10 IR-Spektrum des Procumbidheptaacetats

Das Acetat des bei der Hydrierung erhaltenen Nebenprodukts ist nach dem Kernresonanz-Spektrum sehr wahrscheinlich ein Hexa-Acetat. Die Hydroxylbande im IR-Spektrum dieser Verbindung (Abb. 11) entspricht vermutlich nur einer Hydroxylgruppe.

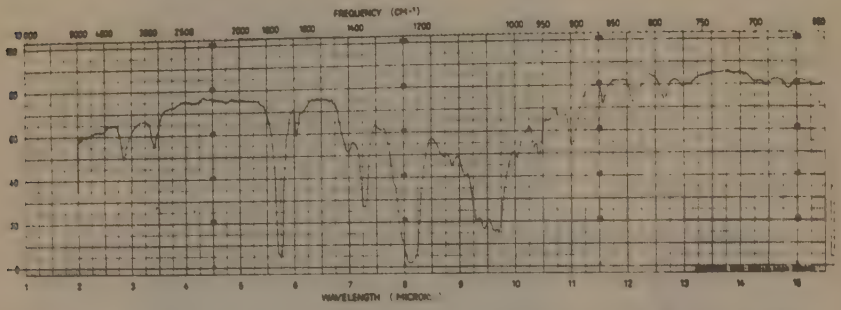
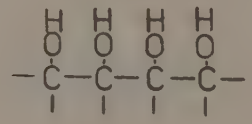


Abb. 11 IR-Spektrum des Acetats des bei der Hydrierung erhaltenen Nebenprodukts.

2.2.2 Perjodat-Oxydation

Bei der Perjodat-Oxydation des Procumbids wurden 5 Mole Perjodat verbraucht. Da für den Glucopyranose-Rest 2 Mole benötigt werden (15), muß das Aglucon folgende Partialstruktur aufweisen:



Eine weitere Hydroxylgruppe wird bei der Hydrolyse des Glucosids freigesetzt. Somit enthält das Aglucon mindestens 5 Sauerstoffatome.

Die bei der Perjodat-Oxydation entstandenen Spaltprodukte konnten wegen der geringen erhaltenen Mengen nicht näher untersucht werden.

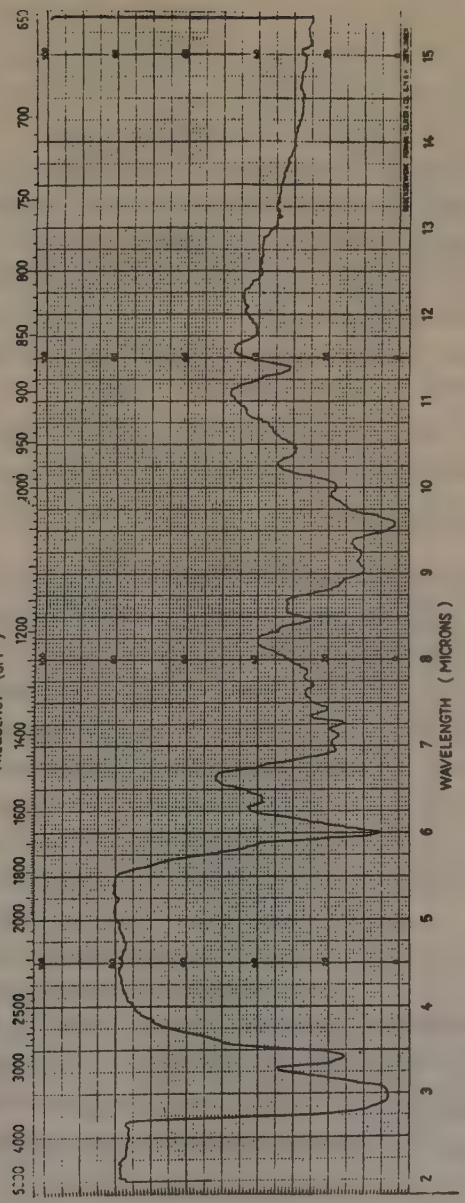


Abb. 12 IR - Spektrum des Procumbid-Aglucons

2.3 Das Aglucon

2.3.1 Isolierung

Bei der Hydrolyse von Procumbid mit Mineralsäuren oder starken organischen Säuren werden hauptsächlich dunkelbraune Zersetzungsprodukte erhalten.

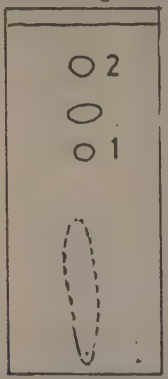
Wird diese Spaltung jedoch mit schwachen Säuren vorsichtig vorgenommen, so kann das Aglucon, nach der schichtchromatographischen Abtrennung der Zersetzungsprodukte in geringer Menge isoliert werden.

Das Aglucon läßt sich auch fassen, wenn das Glukosid mit dem ß-Glykosidasen enthaltenden Fermentpräparat 2073 der Firma RÖHM und HAAS, Darmstadt, gespalten wird. Daraus ist auf die ß-glukosidische Bindung des Zuckerrestes zu schließen.

Im IR-Spektrum des Aglucons sind die C-Methylbande bei 2900 cm^{-1} und die Doppelbindungsbande im Bereich von 1660 cm^{-1} stark ausgeprägt (Abb. 12).

2.3.2 Hydrierungsprodukte

Abb. 13 Dünnschichtchromatogramm des hydrierten Aglucons



Fließmittel: n-Butanol/Eisessig/Wasser 4 : 1 : 2

Sprühreagenz: konz. Schwefelsäure/Aethanol 1 : 1

1 Dihydroaglucon Rf-Wert 0,61

2 Lacton Rf-Wert 0,88

Das flüssige Aglucon ist unbeständig. Wird es hydriert, so entstehen vor allem zwei Produkte.

Die eine Substanz mit dem Rf-Wert 0,61 (Abb. 13) ist das Dihydroaglukon. Das IR-Spektrum dieser Verbindung weist keine Doppelbindungsbande, dafür aber eine deutlich ausgeprägte CH_2-Valenzschwingungsbande auf. Es kann durch Oxydation in die Substanz mit dem Rf-Wert 0,88 übergeführt werden.

Diese läßt sich durch Ausschütteln der wässrigen Lösung des Hydrierungsansatzes mit Äther oder Chloroform isolieren.

Im IR-Spektrum der Verbindung fällt eine starke Carbonylbande bei 1720 cm^{-1} sowie eine C-O-Esterbande im Bereich von 1270 cm^{-1} auf (Abb. 14).

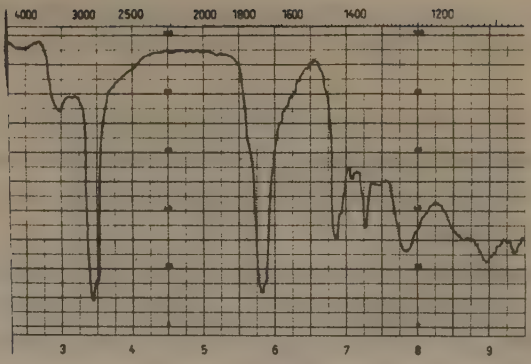


Abb. 14 IR-Spektrum des Lactons

2.3.3 Zur Struktur eines Lactons

Da die Carbonylbande nur wenig gegenüber der eines aliphatischen Ester-Carbonyls verschoben war, wurde das Vorliegen eines Lactons vermutet.

Die Carbonylbanden von Lactonen erscheinen nur dann fast an der gleichen Stelle des IR-Spektrums wie die Carbonylbanden offenkettiger Ester, wenn die Spannung im entstehenden Ring sehr klein ist.

Am geringsten ist diese Spannung in einem Sechsring.

Nach RASMUSSEN und BRATTAIN (16) erfolgt die Carbonylabsorption des δ-Valerolactons bei 1738 cm^{-1}. Eine unter denselben Bedingungen auf dem zur Verfügung stehenden Gerät untersuchte authentische Probe zeigte die Carbonylabsorption jedoch bei 1720 cm^{-1}.

Daher war auch für die isolierte Substanz die Bindung der Carbonylgruppe in einem spannungsarmen Sechsring anzunehmen.

Die Estergruppierung wurde durch den positiven Ausfall der Hydroxamsäure-Reaktion (17) nachgewiesen.

Der Nachweis der Lactongruppierung gelang mithilfe der Lactontitration nach PREGL (18). Der hierbei festgestellte Verbrauch an Lauge entsprach etwa einer Carboxylgruppe und ergab ein Äquivalentgewicht zwischen 211 und 228. (Molekulargewicht des Dihydroaglucons: 220).

Die Bildung eines δ-Lactons durch Oxydation des Dihydroaglucons weist auf den Dihydropyran-Ring hin, der für Iridoide (13) charakteristisch ist.

Der Verlauf der Carbonylabsorption im IR-Spektrum zeigte darüber hinaus an, daß neben der glukosidischen Hydroxylgruppe wahrscheinlich noch mindestens eine der beiden sekundären Hydroxylgruppen des Cyclopentanrings oxydiert worden ist.

Für das Vorliegen eines carbocyclischen Ketons neben dem Lacton-Carbonyl spricht die UV-Absorptionskurve.

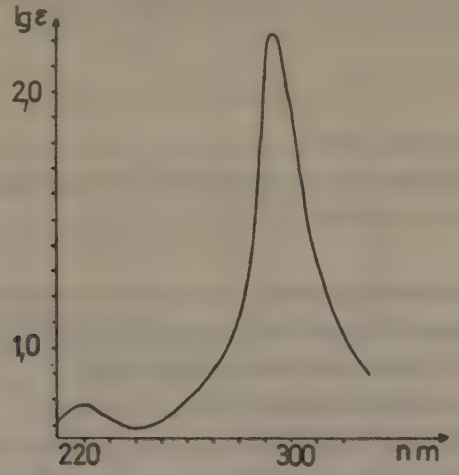


Abb. 15 UV-Spektrum des Lactons (Chloroform)

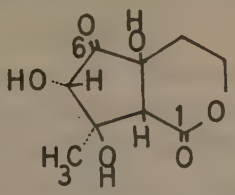
Das Maximum bei 299 nm (ε 162) läßt auf das Vorliegen eines Cyclopentan-Carbonyls schließen, während das Maximum bei 221 nm (ε 5, 8) der Lactongruppierung zuzuordnen sein dürfte.

Oberhalb 300 nm konnte, auch in Aethanol, kein weiteres Maximum festgestellt werden, wie das für α-Diketone zu erwarten wäre (19). Daraus folgt, daß sehr wahrscheinlich nur e i n e der sekundären Hydroxylgruppen oxydiert wird.

Einen Hinweis auf die Lage der Carbonylgruppe im Cyclopentanring liefert die Größe der Extinktion.[x)]

x) Verbenalin und Dehydrologanin (29) unterscheiden sich durch die Lage der Carbonylgruppe im Cyclopentanring: Verbenalin weist die Carbonylgruppe in 6-, Dehydrologanin in 7-Stellung auf. Die Extinktion beträgt für Verbenalin 160, für Dehydrologanin 44.

Für das Lacton wird folgende Struktur vorgeschlagen:

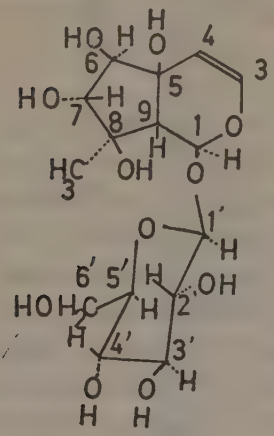


2.4 Nachweis der Glucose

Der Nachweis der bei der säurehydrolytischen oder fermentativen Spaltung freigesetzten Glucose erfolgte papier- und dünnschichtchromatographisch unter Verwendung verschiedener Fließmittel und Sprühreagenzien durch Vergleich mit authentischer Substanz.

2.5 Kernresonanzspektren [x]

2.5.1 Zuordnung der Signale



Das NMR-Spektrum des Glukosids (Abb. 16) weist zwischen 6,62 und 4,9 ppm 4 Dubletts auf, die je einem Proton entsprechen.

Das an der tiefsten Stelle gelegene Dublett (J = 6,5 Hz) stammt vom Vinylproton in 3-Stellung, in unmittelbarer Nachbarschaft des Enoläthersauerstoffs.

Wird bei der Frequenz dieses Protons eingestrahlt, so fällt das Dublett bei 5,0 ppm (J = 6,5 Hz) zum Singulett zusammen. Dieses Signal muß also vom benachbarten zweiten Proton der Doppelbindung in 4-Stellung herrühren. Da auch dieses Proton als Dublett und nicht als Multiplett erscheint, kann am benachbarten Kohlenstoff-Atom in 5-Stellung kein Wasserstoff-Atom stehen.

---

x) Herrn Dr. Melera von der Firma Varian A.G., Zürich danke ich herzlich für die sorgfältige Aufnahme der NMR-Spektren des Glucosids und des Pentacetats auf dem Varian-HA-100-Gerät.

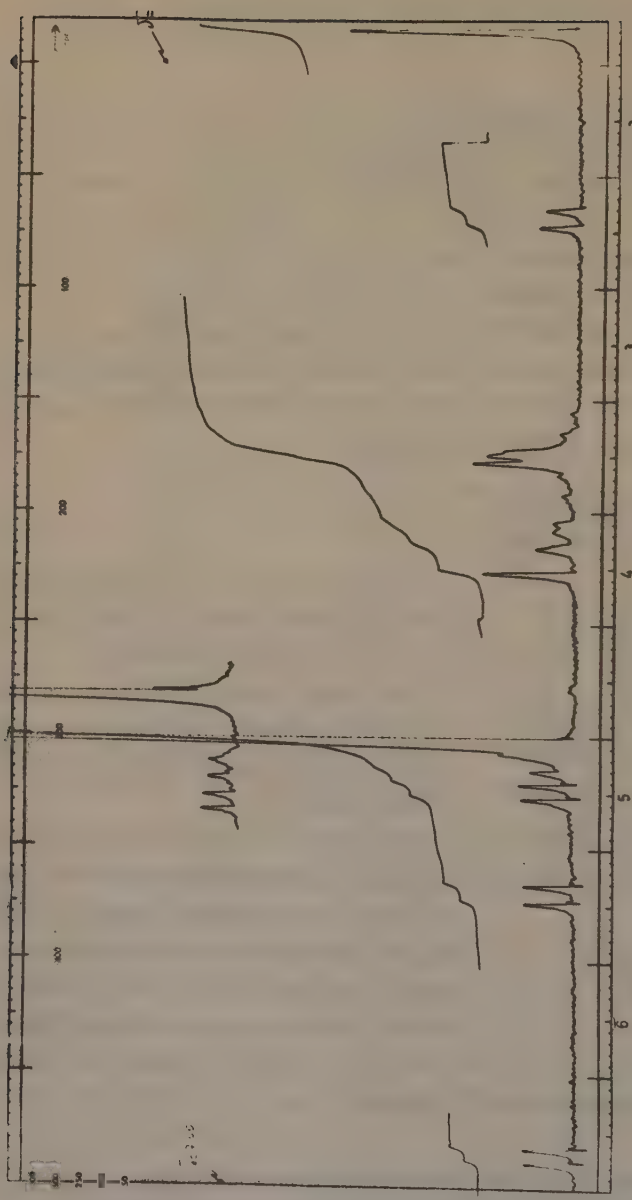


Abb. 16 NMR - Spektrum des Procumbids

Das Dublett bei 5,45 ppm (J = 8 Hz) wird von dem Proton am Kohlenstoff-Atom in 1-, das Dublett bei 4,93 ppm (J = 7,5 Hz) von dem Proton des Kohlenstoff-Atoms in 1'-Stellung ausgelöst [x].

Das verbreiterte Singulett bei 4,05 ppm kann der Methylengruppe am Kohlenstoff-Atom 6', das schwach gekoppelte Dublett bei 3,8 ppm (1 H; J = 4 Hz) dem Proton am Kohlenstoff-Atom 5' zugeschrieben werden.

Wird bei der Frequenz des Dubletts bei 5,45 ppm (Proton an C 1) eingestrahlt, so fällt das Dublett bei 2,45 ppm (1 H; J = 8 Hz) zum Singulett zusammen. Dieses Signal ist daher dem Proton am Kohlenstoff-Atom in 9-Stellung zuzuordnen.

Das stark verbreiterte Signal bei 3,9 ppm (1 H) entspricht vermutlich dem Proton am Kohlenstoff-Atom 6. Das Proton am Kohlenstoff-Atom in 7-Stellung ist dann in dem Multiplett (Zentrum 3,5 ppm) enthalten, das sich vor allem aus den Signalen für die C-Protonen der sekundären Hydroxylgruppen des Glucopyranose-Restes an C 2', C 3' und C 4' zusammensetzt.

Das scharf ausgeprägte Singulett bei 1,55 ppm (3 H) rührt von den Protonen der Methylgruppe in 8-Stellung her. Lage und Beschaffenheit dieses Signals ergeben, daß das Kohlenstoff-Atom in 8-Stellung außerdem hydroxylsubstituiert ist.

Diese Zuordnungen werden durch das NMR-Spektrum des Procumbidpentaacetats (Abb. 17) bestätigt. In diesem Spektrum müssen alle Kohlenstoff-Protonen der acetylierten Hydroxylgruppen ins tiefere Feld verlagert sein. Allerdings ist der Lösungsmitteleinfluß zu berücksichtigen, da das Spektrum des Pentaacetats in Deuterochloroform aufgenommen werden muß.

Aus der Größe der Verschiebung ist auf die Art der Hydroxylgruppen zu schließen. Die teilweise Verlagerung des Multipletts von 3,5 ppm (D_2O; 5-6 H) nach 5,04 ppm ($CDCl_3$; 4 H) entspricht der auch sonst bei der Veresterung sekundärer Hydroxylgruppen beobachteten Verschiebung [xx].

---

x) Das scharf ausgeprägte Signal bei 4,78 ppm wird durch den Austausch der Hydroxylprotonen mit dem in D_2O enthaltenen Wasser bewirkt (20). Bei Raumtemperatur überlagert dieses Signal das Dublett für das Proton an dem Kohlenstoff-Atom 1' und wird erst durch Erwärmen der Lösung auf 60 °C ins höhere Feld verschoben.

xx) Für Kohlenhydrate wird bei der Veresterung einer primären alkoholischen Gruppe die Verlagerung von 2 Protonenresonanzen um etwa 0,5 ppm und bei der Veresterung einer sekundären die Verlagerung 1 Protonenresonanz um 1-1,2 ppm beobachtet (21). Die hier etwas erhöhte Verschiebung ist mit der glukosidischen Bindung und dem Lösungsmitteleffekt zu erklären.

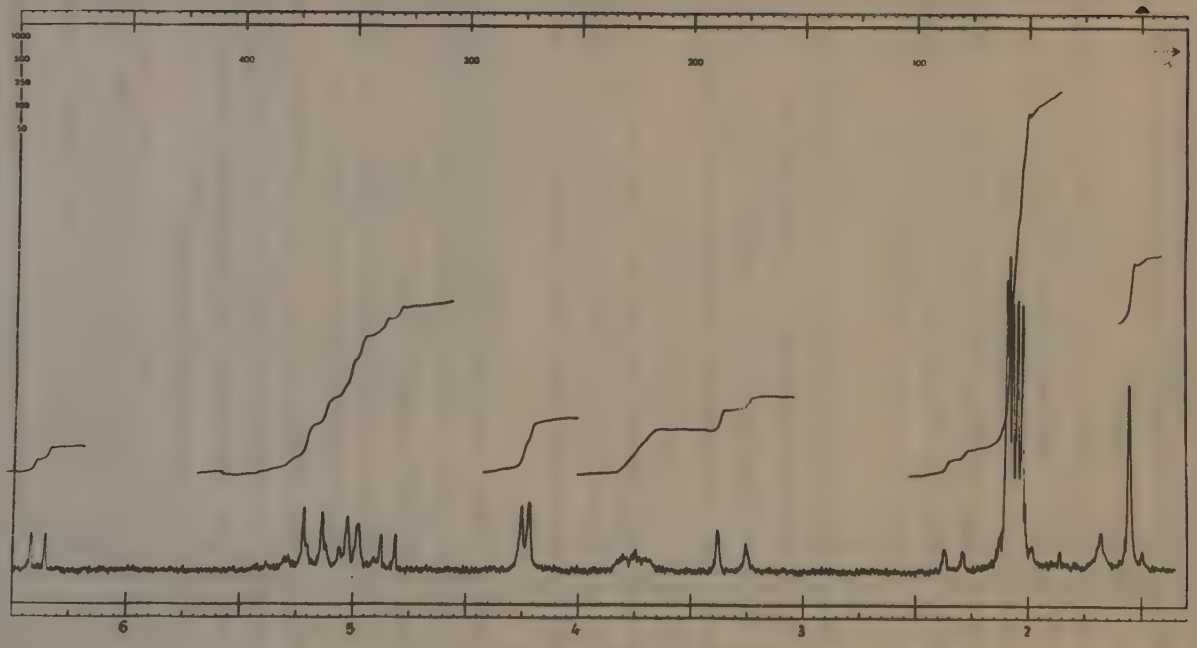


Abb. 17 NMR-Spektrum des Procumbid-Pentaacetats

Die Methylsignale der Acetylgruppen liegen bei 1,99, 2,02, 2,04, 2,05 und 2,07 ppm. Eine Aufnahme dieses Spektralbereichs bei verminderter Aufnahmegeschwindigkeit zeigt, daß wirklich nur das P e n t a - Acetat der Verbindung vorliegt.

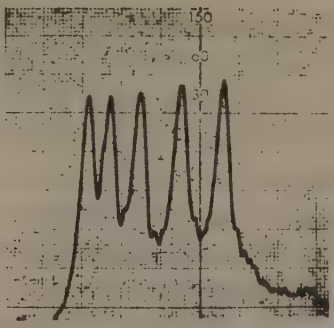


Abb. 18 Acetylbereich bei 2,0 ppm aus dem NMR-Spektrum des Pentaacetats: 1:5 gedehnt.

Da als nächst höheres Acetylierungsprodukt das Hepta-Acetat erhalten wird, müssen zwei der im Pentaacetat noch vorhandenen drei freien Hydroxylgruppen - offenbar infolge sterischer Hinderung - schwer acetylierbar sein. Die dritte Hydroxylgruppe wird überhaupt nicht acetyliert.

Bei den nicht acetylierten Hydroxylgruppen des Pentaacetats handelt es sich um die Hydroxylgruppen in 5-, 7- und 8-Stellung. Dem geminalen Proton der sekundären Hydroxylgruppe in 7-Stellung ist wahrscheinlich das kaum aufgespaltene Signal bei 3,38 ppm zuzuordnen. Dieses Signal spricht auf verschiedene Entkopplungsversuche nicht an. Daraus ist zu schließen, daß die C-Protonen in 6- und 7-Stellung keine Spinkopplung aufweisen.

Das Dublett für das Proton an C 1 ist nach 5,18 ppm verschoben. Die Aufspaltung der beiden Peaks (1,5 Hz) wird durch "long-range"-Kopplung mit dem Proton in 3-Stellung bewirkt.

Das breite Signal (Multiplett) bei 3,75 ppm (Zentrum) wird sehr wahrscheinlich durch die Protonen an C 1' und C 5', das Dublett bei 4,24 ppm (2 H; J: 3,5 Hz) von den Methylenprotonen an C 6' hervorgerufen. Wird daher zusätzlich bei 3,75 ppm eingestrahlt, so vereinfacht sich das Signal bei

4,24 ppm zum Singulett. Wird jedoch bei 4,24 ppm eingestrahlt, so verändert sich das Signal bei 3,75 ppm nur teilweise. Im gleichen Bereich (3,33-4,33 ppm) befinden sich allgemein die Signale für die Protonen an C 5' und C 6' bei acetylierten Kohlenhydraten (20)

Das NMR-Spektrum des Hexa-Acetats zeigt neben der Vermehrung der Acetylsignale bei etwa 2,0 ppm (Zentrum des Multipletts) auch eine Verstärkung des kaum aufgespaltenen Protonenmultipletts (Zentrum 5,04 ppm) im niederen Feld. Außerdem ist das Signal bei 3,38 ppm (C-Proton in 7-Stellung) nach 4,25 ppm verschoben.

In den Spektren beider Acetate wird das Signal für die Methylgruppe am Kohlenstoff-Atom in 8-Stellung nicht verlagert. Die Veresterung der geminalen Hydroxylgruppe hätte eine Verlagerung von 0,3 - 0,4 ppm zur Folge (8). Da das NMR-Spektrum des Heptaacetats noch nicht vorliegt, ist es nicht möglich, nachzuweisen, welche der beiden tertiären Hydroxylgruppen (5- oder 8-Stellung) sich nicht oder nicht beständig acetylieren läßt.

Daß die Signale bei 6,62 und 5,0 ppm im Spektrum des Glukosids (D_2O) und bei 6,38 und 4,85 ppm im Spektrum des Pentaacetats ($CDCl_3$) von den Protonen der Doppelbindung stammen, wird durch die Spektren der hydrierten Derivate bewiesen, da diese dort fehlen. Wegen der erhöhten Abschirmung werden fast alle Protonensignale ins höhere Feld verlagert.

Im Spektrum des Dihydroprocumbids (D_2O; 60 MHz) erscheinen die Protonen der Methylengruppe am Kohlenstoff-Atom 3 zusammen mit den C-Protonen der Kohlenstoff-Atome 6 und 7 als Multiplett bei 3,85 ppm. Die Methylenprotonen am C-Atom 4 bilden wahrscheinlich das kaum aufgespaltene Singulett bei 2,0 ppm.

Ähnliche Veränderungen zeigt das NMR-Spektrum des Lactons ($CDCl_3$; 100 MHz). Die Protonen an C 3 bewirken hier ein Multiplett bei 4,2 ppm, die an C 4 ein Multiplett bei 2,83 ppm. Die Methylgruppe an C 8 bildet ein stark verbreitertes Singulett bei 1,75 ppm aus. Einscharfes Singulett bei 2,03 ppm ist wahrscheinlich dem Proton an C 9 zuzuordnen.

2.5.2 Sterische Verhältnisse

Aus dem enzymatischen Abbau des Glukosids mit ß-Glykosidasen ergibt sich die ß-glukosidische Verknüpfung mit dem Glucopyranose-Rest.

Diese Konfiguration wird durch das NMR-Spektrum bestätigt. Sowohl die Lage als auch die Kopplungskonstante für das Proton am Kohlenstoff-Atom 1' (4,83 ppm, 7,5 Hz) sind typisch für die bei ß-Konfiguration vorliegende axial-axiale Anordnung der Protonen an C 1' und C 2' (20). Die ursprünglich angenommene α-Konfiguration (9, 11) müßte ein Signal im tieferen Feld (unterhalb 5 ppm) und eine für die in diesem Fall axial-äquatoriale Anordnung der beiden Protonen-Ebenen charakteristische Kopplungskonstante von 3 Hz zur Folge haben.

Aus der Größe der Verschiebungen der Methylsignale der Acetylgruppen kann nur bedingt auf die axiale oder äquatoriale Anordnung der Acetylreste geschlossen werden. Der Abstand zwischen dem höchstgelegenen und dem tiefstgelegenen Methylsignal entspricht mit 6,5 Hz dem bekannten Unterschied zwischen axial und äquatorial angeordneten Acetylgruppen. Axial angeordnete Acetylgruppen weisen die Methylsignale stets im tieferen Feld als äquatoriale auf (22).

Diese Verschiebungen werden aber auch durch andere Faktoren außer der Konfiguration beeinflußt (23). Daher können daraus allein noch keine sicheren Schlüsse über die Anordnung der Hydroxylgruppen gezogen werden.

Lediglich die Anordnung der Hydroxylgruppe in 7-Stellung, durch die sich Procumbid von Harpagid unterscheidet, läßt sich genauer festlegen. Sie folgt aus der Größe der Verschiebung, die ihre Einführung auf das Signal der tertiären Methylgruppe in 8-Stellung auslöst. Liegt nämlich dieses Signal im Spektrum des Harpagids (D_2O; 60 MHz) bei 1,25 ppm, so ist es im Spektrum des Procumbids (D_2O ; 60 MHz) nach 1,55 ppm verschoben. Aus dieser Verschiebung um 0, 3 ppm folgt, daß die Hydroxylgruppe in 7-Stellung und die Methylgruppe in 8-Stellung einander angenähert, also cis-ständig, sein müssen. Verschiebungen gleicher Größenordnung und unter ähnlichen Voraussetzungen konnten auch an einer Reihe von Steroiden nachgewiesen werden (24).

Da die beiden Protonen an C 6 und C 7 anscheinend nicht miteinander koppeln und die an diesen Kohlenstoff-Atomen stehenden geminalen Hydroxyl-

gruppen nicht gleichzeitig zu acetylieren sind, ist zunächst für die beiden Protonen und damit auch für die beiden Hydroxylgruppen cis-Anordnung gefolgert worden.

Wie das Kalotten-Modell des Cyclopentanrings (Abb. 19) aber zeigt, weist dieser eine leichte Torsion (Envelop-Form) auf. Dadurch werden auch bei trans-Stellung die Ebenen der beiden Protonen an C 6 und C 7 einander auf etwa 100° angenähert. Bei Winkeln von 70 - 120° werden keine oder nur geringe Kopplungskonstanten beobachtet (25).

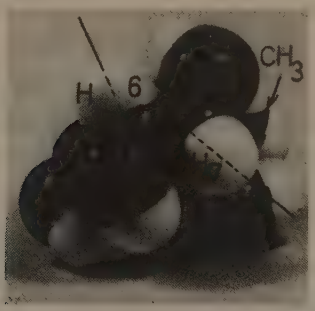


Abb. 19 Protonen an C 6 und C 7 am Kalotten-Modell

Die Acetylierung der Hydroxylgruppe in 7-Stellung wird schon durch die benachbarte Methylgruppe erschwert.

Aus diesen Ergebnissen kann daher nicht endgültig auf die gegenseitige Anordnung der Substituenten in 6- und 7-Stellung zueinander geschlossen werden.

Die Größe der Kopplungskonstanten der Signale für die Protonen an C 3 und C 4 (J = 6,5 Hz) ist charakteristisch für cis-ständige Olefinprotonen in einem 6-Ring.

Ebenfalls typisch für Protonen an einem sechsgliedrigen Ring ist die Kopplungskonstante 8 Hz für die Protonen an C 1 und C 9. Daraus ergibt sich ein Winkel zwischen den Protonenebenen von 180° und die axiale Anordnung der beiden Protonen (26). Die Größe der Kopplungskonstanten ist bei

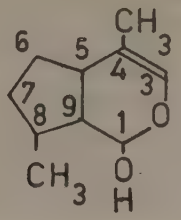
äquatorialer Anordnung eines oder beider Protonen nur 1/3 bis 1/2 so groß wie bei bisaxialer Anordnung (22).

Aus der axialen Lage des Protons an C 1 folgt die äquatoriale Anordnung des O-Glucosylrestes und die Konformation des Dihydropyran-Rings. Nur wenn dieser in Wannenform vorliegt, können die beiden Protonen die trans-Lage annehmen, in der eine Kopplung unter 180° möglich ist.

Damit ist auch die cis-Verknüpfung der beiden Ringe wahrscheinlich. Der endgültige Beweis dafür ist jedoch erst mithilfe des NMR-Spektrums des bisher nicht erhaltenen Octa-acetylprocumbids möglich.

2.5.3 Einfluß struktureller Unterschiede auf die Kernresonanz-Spektren von Iridoiden.

Den bisher aufgefundenen Iridoiden (13) liegen vier Substanztypen zugrunde, deren glukosefreies Grundgerüst vom Enolhalbacetal des Iridodials abgeleitet werden kann:



Substanzen des Typs I tragen in 4-Stellung eine Carboxylfunktion. Bei den Substanzen des Typs II ist die 4-Stellung nicht substituiert. Wird auch die Methylgruppe in 8-Stellung entfernt, so liegt Typ III vor, während der Substanztyp IV wahrscheinlich durch zusätzlichen Einbau von 4-C-Atomen (in Form von Acetessigsäure) in das Grundgerüst I gebildet wird (34).

Ist die Doppelbindung in 4-Stellung durch eine Carboxylgruppe substituiert (Typ I und IV), so erscheint das Signal für das Proton an C 3 als Singulett und im tiefen Feld (unterhalb 7 ppm).

Typ I	Asperulosid-Acetat	(13)	7,28 ppm
	Genipin	(28)	7,52 ppm
	Loganin	(29)	7,33 ppm
	Monotropein-Acetat	(30)	7,32 ppm
Typ IV	Plumericin	(35)	7,43 ppm

Ist die Doppelbindung n i c h t substituiert (Typ II und III), so erhöht sich die Abschirmung des Protons an C 3, und das Signal tritt bei etwa 6,2 ppm auf.

Die Struktur dieses Signals (Dublett, Multiplett) hängt jedoch auch von Substituenten in 5-Stellung ab. Daher erscheint das Signal als Multiplett in den Spektren des Aucubins (31) bei 6,18 ppm und des Catalposids (32) bei 6,38 ppm. Beide Verbindungen sind in 5-Stellung nicht substituiert.

Besonders aufschlußreich im NMR-Spektrum eines Iridoids ist das Signal für das Proton an C 1. Hieraus ergibt sich nicht nur die gegenseitige Anordnung der P r o t o n e n in 1- und 9-Stellung, sondern auch die Konfiguration des G l u c o p y r a n o s e - Restes an C1.

Da das Proton an C 1 gegen den Einfluß der Doppelbindung und von Substituenten in 4- oder 5-Stellung gut abgeschirmt ist, können in diesem Zusammenhang Verbindungen der verschiedenen Typen miteinander verglichen werden:

Typ I	Genipin	4,81[x] ppm	J = 9 Hz
	Asperulosid-Acetat	5,68 ppm	J = 1-1,2 Hz
	Monotropein-Acetat	5,52 ppm	J = 3 Hz
Typ II	Aucubin-Acetat	5,25 ppm	J = 5-6 Hz
Typ III	Unedosid-Acetat (33)	5,6 ppm	J = 9,5 Hz

Aus der Größe der Kopplungskonstanten wird für Genipin, Unedosid und Aucubin bisaxiale trans-Lage und für Asperulosid und Monotropein die axial-

---

x) Genipin trägt in 1-Stellung keinen acetylierten Glucopyranose-Rest, daher die höhere Abschirmung des Signals.

äquatoriale Anordnung der Protonen an C 1 und C 9 gefolgert. Der Glucopyranose-Rest soll bei allen Verbindungen äquatorial angeordnet sein.

Das Signal für das Proton an C 3 tritt im NMR-Spektrum des Procumbids als Dublett und bei 6,55 ppm auf. Dadurch wird bestätigt, daß die Doppelbindung nicht substituiert ist, das Aglucon des Procumbids also nur aus 9 Kohlenstoff-Atomen besteht und in die Reihe der Iridoide vom Typ des Aucubins (Typ II) gehört. Die 5-Stellung ist durch eine Hydroxylgruppe substituiert.

Aus der geringfügigen Kopplung in den NMR-Signalen für die Protonen an C 1 und C 9 des Harpagids war auf einen Winkel von 90° zwischen den Protonenebenen, die äquatoriale Anordnung des Protons an C 1 und die axiale Anordnung des Glucopyranose-Restes geschlossen worden (8).

Im Procumbid ist dagegen das Proton an C 1 axial und der Glucopyranose-Rest äquatorial angeordnet.

Dieser sterische Unterschied zwischen Procumbid und Harpagid kommt auch in der L a g e der Resonanzsignale zum Ausdruck. So entspricht die Lage des Signals für das Proton an C 1 im Spektrum des Harpagids bei 5,75 ppm der äquatorialen, die für das C 1-Proton im Spektrum des Procumbids bei 5,45 ppm der bei axialer Anordnung höheren Abschirmung (27). Entsprechend sind auch die Signale für die Protonen an C 9 in den beiden NMR-Spektren charakteristisch verschoben. Dieses Signal befindet sich für Harpagid (60 MHz; D_2O) bei 2,58 ppm, für Procumbid (60 MHz; D_2O) bei 2,40 ppm.

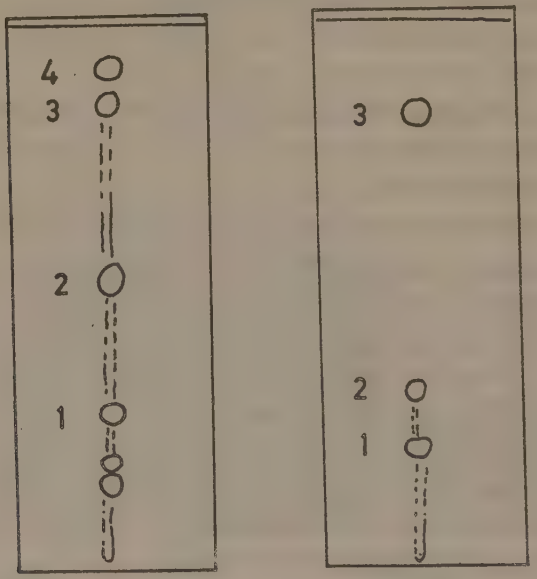
Aufgrund der chemischen und physikalischen Befunde wird für Procumbid folgende Konfigurationsformel vorgeschlagen:

Abb. 20 DREIDING-Modell des Procumbid-Aglucons.

IV INHALTSSTOFFE DES PETROLÄTHEREXTRAKTES

Die Extraktion des Drogenpulvers mit Petroläther lieferte einen dunkelbraunen, aromatisch riechenden Extrakt, dessen dünnschichtchromatographische Prüfung vor allem fünf Hauptbestandteile erkennen ließ (Abb. 21).

Abb. 21 Dünnschichtchromatogramme des Petrolätherextrakts



Fließmittel: I Petroläther/Äther 9:1
II Chloroform

Sprühreagenzien: I konz. Schwefelsäure/Aethanol 1:1 (v/v)
II Antimon(III)chlorid/Chloroform 1:9 (g)

Die Flecken 1 und 2 im Dünnschichtchromatogramm I (Abb. 21) werden wahrscheinlich von Fettsäureestern verursacht. Fleck 3 stammt von einem Carotinoid, Fleck 4 von Kohlenwasserstoffen. Im Dünnschichtchromatogramm II zeigt Fleck 3 als weiteren Bestandteil ein Steroid an, das Carotinoid tritt hier als Fleck 1 auf.

1 Die Kohlenwasserstoffe

Aus den Fraktionen 1 - 31 der säulenchromatographischen Auftrennung des Petrolätherextraktes wurde eine vaselineartige Masse erhalten, die 9,6 % des Extraktes entsprach.

1.1 Gesättigte Kohlenwasserstoffe

Die Hauptmenge der gesättigten Kohlenwasserstoffe fand sich in den Fraktionen 1 - 10. Aus dem Rückstand dieser Fraktionen ließ sich mit Methanol oder Aethanol ein Teil kristallin abscheiden. Dieser zeigte nach mehrmaligem Umkristallisieren das Schmelzintervall 65 - 68°C.

Die IR-Spektren des Kristallisats und des öligen Rückstandes weisen deutliche Unterschiede auf (Abb. 22/23).

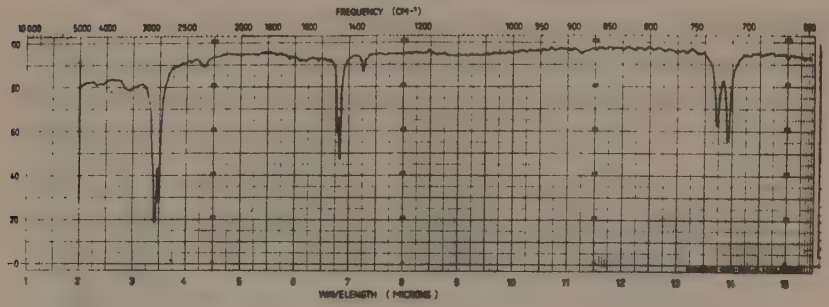


Abb. 22 IR-Spektrum des kristallinen Kohlenwasserstoffs

Vor allem ist die C-Methylbande bei 1370 cm^{-1} im Spektrum des Kristallisats deutlich vermindert.

Beiden Spektren fehlen Banden im Doppelbindungsbereich.

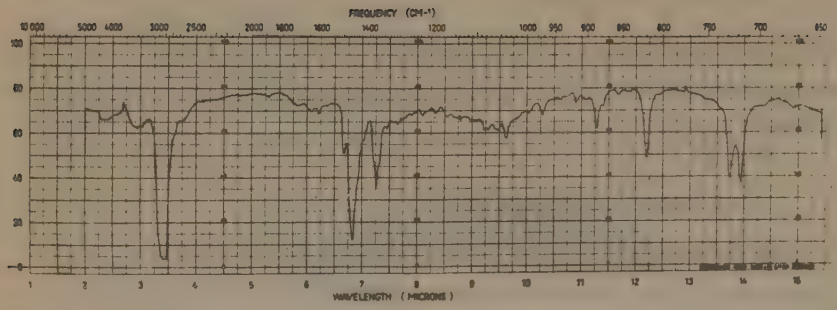


Abb. 23 IR-Spektrum des öligen Rückstandes

Ein Vergleich der Gaschromatogramme der Gesamtfraktion der Kohlenwasserstoffe (Abb. 24) und des daraus abgetrennten kristallinen Anteils (Abb. 25) zeigt an, daß die Gesamtfraktion noch nieder siedende Anteile enthält.

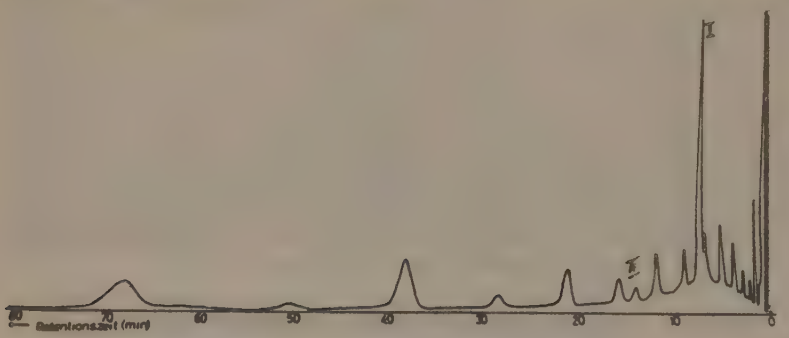


Abb. 24 Gaschromatogramm der Gesamtfraktion der Kohlenwasserstoffe (Bedingungen s.S. 57)

Diese nieder siedende Fraktion setzt sich, wie aus der verstärkten C-Methylbande des IR-Spektrums des öligen Rückstandes (Abb. 23) hervorgeht, vor allem aus verzweigten Anteilen zusammen.

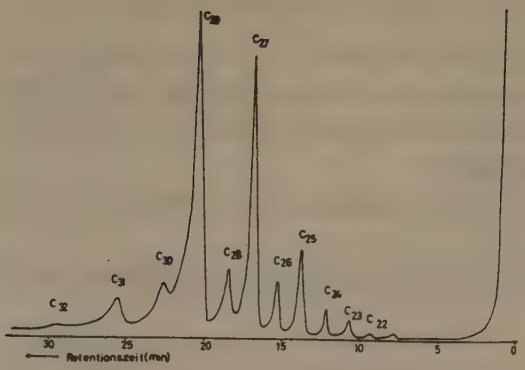


Abb. 25 Gaschromatogramm des kristallinen Kohlenwasserstoffgemisches (Bedingungen s. S. 57)

Das kristalline Kohlenwasserstoffgemisch besteht aus den n-Alkanen C_{21}-C_{32}, wie sowohl durch Mischchromatogramme als auch durch die nach KOVATS (36) berechneten Retentionsindices bestätigt wird. Diese weisen die für homologe Reihen charakteristische Erhöhung der Werte um etwa 100 Einheiten je CH_2-Gruppe auf.

Tabelle 1 Retentionsindices der n-Kohlenwasserstoffe

Anzahl der C-Atome	Retentionsindex
21	2105,0
22	2201,0
23	2294,7
24	2402,0
25	2502,0
26	2599,0
27	2699,0
28	2798,5
29	2902,0
30	2998,0
31	3107,0
32	3201,0

Die Retentionsindices der Bestandteile der niedersiedenden Fraktion weichen von diesen Werten erheblich ab. So ergibt sich für die Substanz I (Abb. 23) der Wert 2035,0, für die Substanz II der Wert 2237,5. Diese beiden Stoffe gehören vermutlich ebenfalls einer homologen Reihe an.

1.2 Ungesättigte und höher verzweigte Kohlenwasserstoffe

Der Rückstand der Fraktionen 11 - 16 ist ein gelbliches Öl, das im Dünnschichtchromatogramm nach dem Besprühen mit Antimon(III)/Antimon (V)-chloridlösung einen intensiv rotvioletten Fleck (Rf-Wert 0,81; Petroläther 9:1) zeigt.

Reaktion und Rf-Wert stimmen mit einer Vergleichsprobe Squalen überein.

Auch das Misch-Gaschromatogramm weist auf Squalen hin.

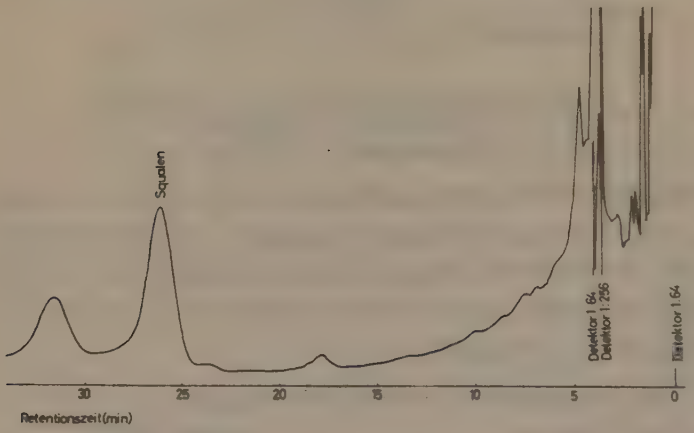


Abb.26 Mischchromatogramm der Fraktion 13 mit Squalen (Bedingungen s.S. 58)

Zum Nachweis des Squalens wurden die gesättigten nicht oder nur wenig methylverzweigten Kohlenwasserstoffe als Harnstoff-Addukt (37) abgetrennt. Der Rückstand des Filtrates dieser Fällung ließ sich zum Thioharnstoff-Addukt (38) umsetzen.

Das Gaschromatogramm des nach der Spaltung dieses Adduktes erhaltenen Öls (Abb.27) weist neben dem Hauptbestandteil Squalen eine weitere Substanz in größerer Menge auf, die auch einen wichtigen Anteil der nieder siedenden Kohlenwasserstoffe im Gaschromatogramm der Gesamtfraktion darstellt. Der Einschluß im Thioharnstoff-Addukt läßt darauf schließen, daß diese Verbindung wie Squalen mehrfach methylverzweigt ist.

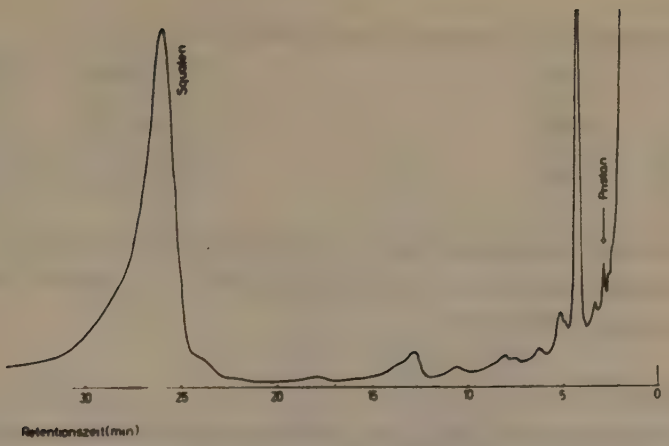


Abb. 27 Gaschromatogramm des nach der Spaltung des Thioharnstoff-Addukts erhaltenen Öls (Bedingungen s. S. 58)

Eine in geringer Menge vorhandene Substanz stimmt in ihrem Retentionsverhalten mit Pristan überein, das sich auch in der Anisfrucht zusammen mit Squalen findet (39).

Die abgeschiedene Substanzmenge reichte nicht zur Darstellung des Squalen-hexahydrochlorids aus. Auch nach längerem Einleiten von Chlorwasserstoff in die Lösung des Stoffes in absolutem Aceton (40) fiel kein Niederschlag aus. Die Reaktionslösung war gegen Ende des Versuchs lediglich intensiv braun verfärbt. Ein derartiges Verhalten wird bei geringen Versuchsmengen beschrieben (41).

Das Spaltprodukt des Harnstoff-Addukts zeigt im Gaschromatogramm eine ähnliche Zusammensetzung wie das kristalline Kohlenwasserstoffgemisch.

Die Fraktionen 17-31 lieferten noch geringe Mengen der Kohlenwasserstoffe mit 28-32 Kohlenstoffatomen.

1.3 Quantitative Zusammensetzung des Kohlenwasserstoffgemisches

Der Anteil der einzelnen Kohlenwasserstoffe an der Gesamtfraktion wurde durch Auswiegen der Peakflächen bestimmt (42).

Die Zusammensetzung ist in Tabelle 2 wiedergegeben.

Tabelle 2

Zusammensetzung des Kohlenwasserstoffgemisches

n-Heneicosan	1,2%	n-Heptacosan	14,3%
n-Docosan	5,4%	n-Octacosan	5,7%
n-Tricosan	4,2%	n-Nonacosan	19,8%
n-Tetracosan	4,8%	n-Tricontan	2,4%
n-Pentacosan	7,2%	n-Hentriacontan	3,1%
n-Hexacosan	6,1%	n-Dotriacontan	1,2%

Die nicht näher untersuchten Kohlenwasserstoffe entsprechen 16,6%. Höher verzweigte oder ungesättigte Kohlenwasserstoffe (z.B. Squalen) sind im Gemisch zu etwa 8 % enthalten.

2. Zusammensetzung des Fettes

Bei der säulenchromatographischen Auftrennung des Petrolätherextraktes fiel zu 11 % des Extraktes ein gelbliches Öl an, dessen IR-Spektrum die für Fettsäureester typischen Banden aufweist:

2960 cm^{-1}	CH_2-Valenzschwingung
2870 cm^{-1}	CH -Valenzschwingung
1740 cm^{-1}	C=O- Valenzschwingung
1460 cm^{-1}	CH-Deformationsschwingung (CH_2-Gruppen)
1370 cm^{-1}	CH-Deformationsschwingung (CH_3-Gruppen)
1250 u. 1170 cm^{-1}	C-O-Valenzschwingung (Estergruppierung)
720-730 cm^{-1}	CH_2-Schwingung (ρ)

Aus dem verseiften Öl wurden die Fettsäuren abgetrennt und als Methylester (43) identifiziert (Abb. 28).

Die quantitative Zusammensetzung wird durch Auswiegen der Peakflächen (42) ermittelt und ist in Tabelle 3 wiedergegeben.

Tabelle 3

Zusammensetzung des Fettes

Palmitinsäure	28 %	Linolsäure	11 %
Palmitölsäure	9 %	Linolensäure	0,8 %
Stearinsäure	5 %	Nicht identifizierte	
Ölsäure	34 %	Fettsäuren	12,2 %

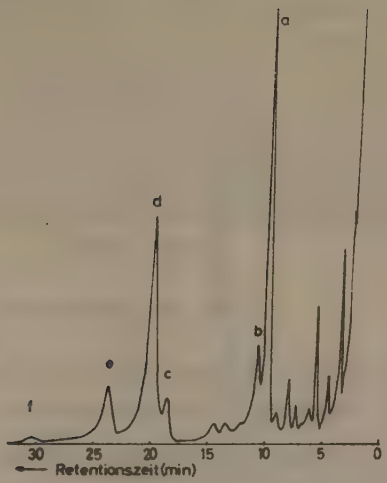


Abb. 28 Gaschromatogramm der Fettsäuremethylester (Bedingungen s. S. 59)

a Palmitinsäure
b Palmitölsäure
c Stearinsäure
d Ölsäure
e Linolsäure
f Linolensäure

3. Zusammensetzung des Wachses

16, 2% des Petrolätherextraktes werden in Form einer leicht gelblich gefärbten kristallinen Substanz gewonnen, die nach mehrmaliger Umkrisallisation zwischen 86-87°C schmilzt. Das IR-Spektrum (Abb. 29) weist die Substanz als Wachs aus.

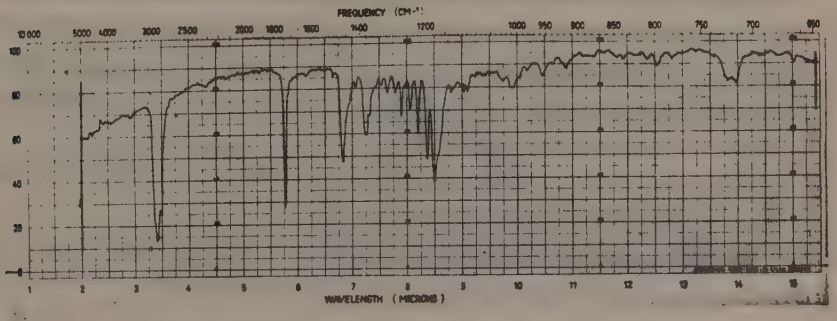


Abb. 29 IR-Spektrum des Wachses

Der nach der Verseifung isolierte Fettsäureanteil war weiß und kristallin (Fp: 57-59°C). Hauptbestandteil ist Palmitinsäure (Abb. 30).

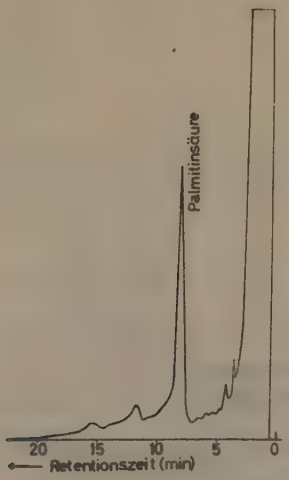


Abb. 30 Gaschromatogramm der Fettsäuremethylester des Wachses (Bedingungen s.S. 59)

Der Alkoholanteil wurde wegen mangelnder Vergleichssubstanzen nicht näher untersucht. Cetyl- und Stearylalkohol waren jedoch nicht nachzuweisen.

4. Bestandteile des Steringemisches

Der Petrolätherextrakt enthält 19,8 % Sterine.

Der nach dem Entfernen des Lösungsmittels sofort kristallin anfallende Rückstand wurde mehrmals aus Methanol umkristallisiert. Die weißen, großen Kristallnadeln schmolzen scharf bei 139°C und zeigten mit dem LIEBERMANN BURCHARD-Reagenz (44) den für Sterine charakteristischen Farbumschlag von violett über blau nach dunkelgrün.

Der negative Verlauf der Reaktion nach TORTELLI-JAFFÉ (45) schloß Sterine mit Δ7- oder Δ 8-Doppelbindungen aus.

Das IR-Spektrum (Abb. 31) zeigt eine schwache Bande bei 970 cm^{-1}, die für eine trans-Δ22-Doppelbindung charakteristisch ist (46).

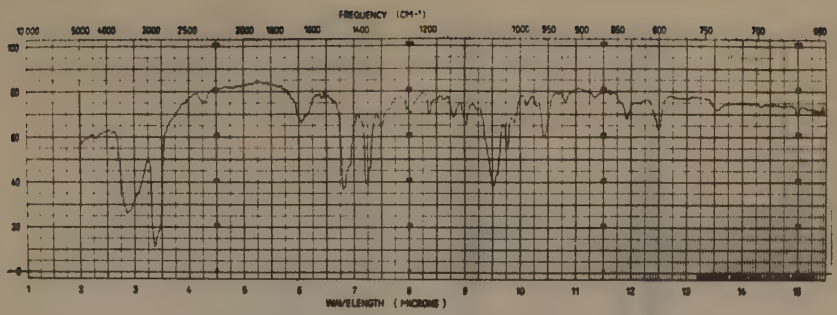


Abb. 31 IR-Spektrum des Sterins

Der Schmelzpunkt des Acetats liegt zwischen 118-119°C, ist also deutlich gegenüber dem des reinen ß-Sitosterinacetats erniedrigt (120-121°C).

Das Vorliegen eines Δ 5,22-Diens konnte durch die Darstellung eines Tetrabromaddukts nachgewiesen werden. Bei diesem Versuch wurde eine kleine Menge einer in Plättchen kristallisierenden Substanz erhalten, die nach dem Umkristallisieren zwischen 206-211°C schmolz.

4.1 Trennung des Steringemisches auf Silbernitrat-Kieselgel-Schichten

Nachdem die dünnschichtchromatographische Prüfung auf Kieselgel-G-Schichten in verschiedenen Fließmitteln keine Trennung zeigte, wurde die Substanz auf silbernitratimprägnierten Kieselgel-G-Schichten untersucht (47).

Nach der zweimaligen Entwicklung weist das Harpagophytum-Sterinacetat zwei Flecken auf (Abb. 32). Der Rf-Wert des intensiveren Flecks (0,57) stimmt mit dem einer Vergleichsprobe ß-Sitosterinacetat, der Rf-Wert des wesentlich schwächeren Flecks (0,5) mit Stigmasterinacetat überein.

Ob der erste Fleck auch noch Campesterinacetat enthält, kann bei den auch unter diesen Bedingungen fast gleichen Rf-Werten von ß-Sitosterin und Campesterin nicht entschieden werden.

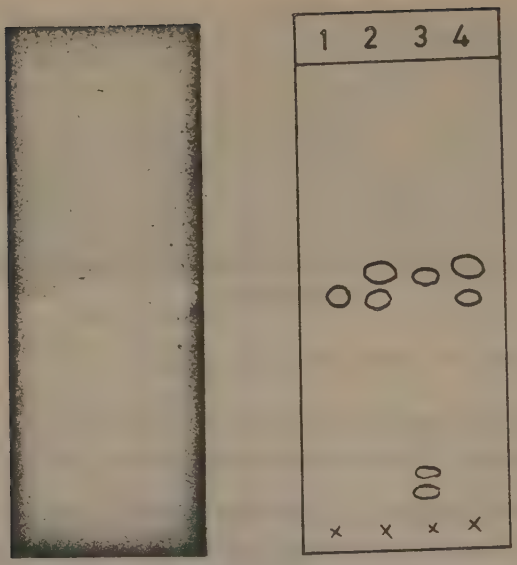


Abb. 32 Dünnschichtchromatogramm der Sterinacetate auf Silbernitrat-Kieselgel

Fließmittel: Petroläther/Chloroform/Eisessig 75:25:0,5
Sprühreagenz: Antimon(III)/Antimon(V)chlorid(Chloroform)

1 Stigmasterinacetat "Roth"
2 ß-Sitosterinacetat "Roth" x)
3 Campesterinacetat xx)
4 Harpagophytum-Sterinacetat

x) ß-Sitosterin "Roth" enthält Campesterin
xx) Das zur Verfügung stehende Campesterinacetat war verunreinigt

4.2 Gaschromatographische Analyse

Die gaschromatographische Trennung der Sterinacetate gab kein befriedigendes Ergebnis (Abb. 33, 1). Die Acetate werden bei den nötigen Arbeitstemperaturen schon im Metall-Einspritzblock zersetzt (48).

Daher wurden die Sterine als Trimethylsilyäther untersucht (51). Dabei konnte neben ß-Sitosterin und Stigmasterin ein dritter Bestandteil nachgewiesen werden. Dieser weist dieselbe Retentionszeit wie das in handelsüblichem ß-Sitosterin oft vorhandene Campesterin auf (Abb. 33, 2).

Da keine authentische Vergleichsubstanz zur Verfügung stand, konnte das Vorliegen von Campesterin nicht endgültig nachgewiesen werden

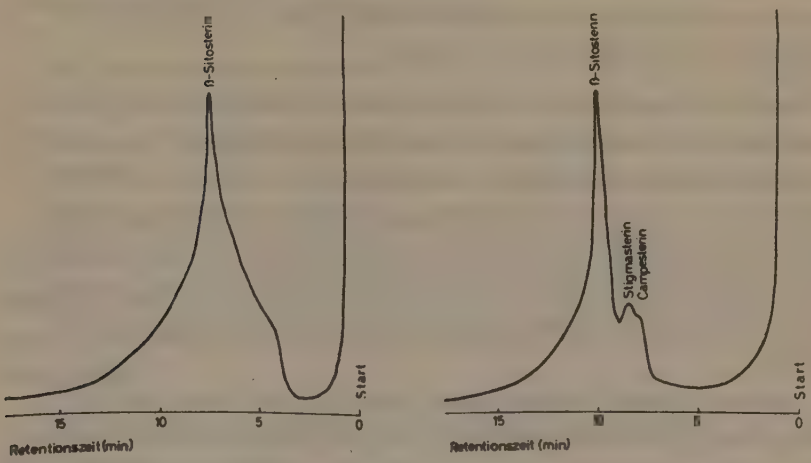


Abb. 33

1 Gaschromatogramm der Sterinacetate

2 Gaschromatogramm der Sterintrimethylsilyläther

Das Gaschromatogramm der Trimethylsilyläther wurde auch quantitativ nach den Angaben von A. ROZANSKI ausgewertet (53).

Das Steringemisch besteht aus

77, 4 % ß-Sitosterin und

18, 6 % Stigmasterin.

Der nicht endgültig identifizierte Anteil (Campesterin) entspricht 4,0 %.

B ZUSAMMENFASSUNG

Das in der getrockneten Wurzel von Harpagophytum procumbens DC zu etwa 0,02 % enthaltene Procumbid gehört zu den Iridoiden (13), liegt als ß-Glucopyranosid vor und hat die Summenformel $C_{15}H_{24}O_{11}$. Es zersetzt sich bei der Einwirkung von Mineralsäure unter Abscheidung von Glucose und eines braunschwarzen Produkts.

Die Verbindung enthält 1 C-Methylgruppe, 8 Hydroxylgruppen und 1 mit Palladium/Aktivkohle leicht hydrierbare Doppelbindung.

Diese Doppelbindung liegt in einem Dihydropyranring als Enoläthergruppierung vor, die nach Ozonisierung und katalytischer Spaltung Formaldehyd und Ameisensäure liefert. Die Anwesenheit des Dihydropyranrings ergibt sich aus der Bildung eines δ-Lactons durch Oxydation des Dihydroaglucons. Die Lage der Doppelbindung wird durch die NMR-Spektren bestätigt.

Die Anzahl und die Anordnung der Hydroxylgruppen folgen aus der Bildung eines Heptaacetats, das noch mindestens eine freie Hydroxylgruppe enthält und aus der Perjodat-Oxydation. Der Perjodat-Verbrauch läßt darauf schließen, daß im Aglucon 4 benachbarte Hydroxylgruppen vorhanden sind.

Die Anordnung wirkt sich besonders in den NMR-Spektren aus. Daraus folgt, daß zwei der Hydroxylgruppen tertiär angeordnet sind. Die eine von diesen steht in unmittelbarer Nachbarschaft zur Doppelbindung des Dihydropyranrings, die andere geminal zur C-Methylgruppe.

Alle Substituenten des Aglucons befinden sich in einem Cyclopentanring, der dem Dihydropyranring annelliert ist.

Damit liegt der Verbindung das für Iridoide charakteristische Ringgerüst zugrunde.

Aufgrund der NMR-Spektren gehört Procumbid in die Reihe der Aucubin-Glukoside, ebenso wie Harpagid und Harpagosid, die in der Droge zu 0,5-0,6% enthalten sind und damit den Gehalt an Procumbid weit übertreffen.

Von besonderem Interesse war ein Vergleich der sterischen Verhältnisse bei Procumbid und Harpagid. Bei beiden Glucosiden sind die Ringe wahrscheinlich cis-verknüpft. Ist jedoch das Proton an C 1 bei Harpagogenin

äquatorial, das Proton an C 9 und der Glucopyranose-Rest axial angeordnet, so haben beide Protonen im Procumbogenin axiale, der Glucopyranose-Rest äquatoriale Lage.

Anscheinend kann das gleiche Fermentsystem in derselben Pflanze verschieden konfigurierte Verbindungen ausbilden.

Die säulenchromatographische Auftrennung des Petrolätherextraktes der Droge liefert als Hauptbestandteile ein Kohlenwasserstoffgemisch, ein Fett, ein Wachs und Sterine. Der Kohlenwasserstoffanteil entspricht 0,05 %, das Fett 0,05 %, das Wachs 0,08 % und das Steringemisch 0,1 % des Drogengewichts.

Durch Kristallisation konnten 75,4% der Kohlenwasserstoffe als n-Alkane abgetrennt und identifiziert werden. Aus dem verbleibenden öligen Rückstand gelang es, durch Adduktbildung mit Harnstoff und Thioharnstoff weitere 8 %, anscheinend höher methylverzweigte Kohlenwasserstoffe, darunter Squalen, abzuscheiden.

Die Hauptbestandteile des n-Alkan-Gemisches sind n-Heptacosan (14,3%) und n-Nonacosan (19,8 %).

Das fette Öl enthält vor allem ungesättigte Fettsäuren. Die Hauptbestandteile sind Palmitinsäure (28 %), Palmitölsäure (9 %), Stearinsäure (5 %), Ölsäure (34 %) und Linolsäure (11 %).

Der Fettsäureanteil des Wachses bestand überwiegend aus Palmitinsäure (71 %).

Das Wachsalkoholgemisch konnte wegen mangelnder Vergleichssubstanzen nicht näher untersucht werden. Cetyl- und Stearylalkohol sind nicht vorhanden.

Das Phytosteringemisch setzt sich vorwiegend aus ß-Sitosterin (77,4 %) und Stigmasterin (18,6 %) zusammen. Ein weiterer Bestandteil ist wahrscheinlich Campesterin (4,0 %).

C EXPERIMENTELLER TEIL

I ALLGEMEINE ANGABEN

Die Schmelzpunkte wurden auf dem Leitz-Mikroskop-Heiztisch 350 bestimmt.

Die spezifische Drehung wurde im Kreispolarimeter 0,05° der Firma Carl Zeiss gemessen.

Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte im Gerät 21 der Firma Perkin-Elmer und dem Gerät IR 10 der Firma Beckmann. Die Spektren der festen Substanzen wurden in Kaliumbromid-Presslingen, die der flüssigen nach kapillarer Verteilung zwischen Natriumchlorid-Platten aufgenommen.

Die Absorptionsspektren im sichtbaren und UV-Bereich wurden mit dem Spektralphotometer PMQ II der Firma Carl Zeiss ermittelt.

Zur Bestimmung der Schmelzpunkte, der spezifischen Drehung und der Absorptionsspektren wurden die Substanzen 5 Stunden bei 12 Torr und 64°C über Blaugel getrocknet. Die Trocknung zur Elementaranalyse erfolgte im Hochvakuum bei 80°C.

Die Gefriertrocknung wurde in der Labor-Gefriertrocknungsanlage der Firma Kniese, Marburg/Lahn vorgenommen.

Die Kernresonanzspektren wurden mit den Varian-Geräten A-60 und HA-100 aufgenommen.

Die Molekulargewichte wurden mit dem Mechrolab-Dampfdruckosmometer bestimmt.

Zur Dünnschichtchromatographie diente Kieselgel G "Merck", zur präparativen Schichtchromatographie Kieselgel G oder GF_{254} "Merck".

Zur Säulenchromatographie wurden Aluminiumoxid stand. nach Brockmann, Celite 535, Clarocarbon F, Kieselgel 0,05-0,2 mm "Merck" und Zellulosepulver S & S 123 verwendet.

Die gaschromatographischen Untersuchungen wurden mit dem Fraktometer F 6/4 HF der Firma Perkin-Elmer in Verbindung mit dem Schreiber "Kompensograph L 288 x 288" der Firma Siemens ausgeführt. Als Detektor diente ein Flammenionisationsdetektor.

Verwendung fanden folgende Säulen

R Polypropylenglykol R 15% auf Celite 545 60-100 mesh

SE 30 1% Silikonkautschuk SE 30 auf Chromosorb W HMDS behandelt 80-100 mesh

SE 52 5% Silikonkautschuk SE 52 auf Celite 545 60-100 mesh

EGS 5% Äthylenglykolsuccinat auf Chromosorb W silanisiert 80-100 mesh.

Angaben über Lösungsmittel beziehen sich, wenn nicht anders angegeben, auf Raumteile.

Die Elementaranalysen führten Herr A. Bernhardt, Mikroanalytisches Laboratorium im Max-Planck-Institut, Mühlheim-Ruhr und Frau I. Beetz, Kronach/Ofr. aus.

II EXTRAKTION DER WURZELDROGE

10 kg grob geschnittene Wurzeldroge von Harpagophytum procumbens DC [x] wurden mit der Drogenmühle und im Starmix möglichst fein zerkleinert und durch ein Sieb mit Maschenweite 0, 75 mm geschlagen.

Das trockene Pulver wurde zunächst mit 50 l Petroläther (Kp 50-70°C) im Perkolationsverfahren entfettet. Die weitgehend vom Lösungsmittel befreiten Auszüge ergaben 19, 3 g.

Anschließend wurde mit etwa 90 l 96%igem Aethanol erschöpfend extrahiert.

Der bräunliche, sehr bittere und hygroskopische Trockenextrakt wog nach dem Trocknen im Vakuum über Blaugel 832, 4 g. Er wurde in zwei ungefähr gleich große Teile geteilt, jeweils mit 2 l Wasser angerieben und im Scheidetrichter dreimal mit je 1 l Aether ausgeschüttelt. Dabei wurden insgesamt 18, 5 g eines braunen harzigen Extraktes erhalten (Aetherextrakt).

Nachdem Harpagid und Hapragosid durch Ausschütteln mit insgesamt 10 l der Mischung n-Butanol-Chloroform 4:1 (Gewichtsteile) vollständig entfernt worden waren, wurde die wässrige Phase gefriergetrocknet.

---

x) Herrn Prof. Dr. O. H. Volk, Institut für Pharmakognosie der Universität Würzburg, sei an dieser Stelle herzlich für die Überlassung der Droge gedankt.

Das so gewonnene gelblich-weiße, süße Pulver war sehr hygroskopisch und wog nach längerer Trocknung 404 g (48,5 % des Gesamtextraktes).

III PROCUMBID

1. Isolierung

1.1 Frakionierung der Wasserphase an Kohle/Celite.

Die Mischung aus je 1 kg Celite 535 und Clarocarbon F "Merck" wurde mit Wasser und 50%igem Aethanol ausgekocht, mit Aceton gewaschen, getrocknet und in ein Rohr von 16 cm ∅ und 1,6 m Länge eingefüllt. Nachdem die Säulenfüllung nochmals gründlich mit Wasser gewaschen worden war, wurde die gesamte Wasserphase (s. Übersicht S. 3) als 10%ige wässrige Lösung aufgegeben. Die Desorption erfolgte mit Wasser, 5%, 15%, 20%, 30% und 96%igem Aethanol. Die 1 l umfassenden Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch auf Einheitlichkeit geprüft und gefriergetrocknet.

Der Verlauf der Desorption geht aus Tabelle 4 hervor.

Tabelle 4

Fließmittel: n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:2

Sprühreagenz: Konz. Schwefelsäure/Äthanol 1:1

Fraktion	Eluierungsmittel	Rückstand g	Eigenschaften	Rf-Werte
1-3	Wasser	11,0	Salziger Geschmack; aminartiger Geruch; braungelb, schmierig	- -
4-15	5% Alkohol	62,5	süß; weiß; hygroskopisch	0,44;0,53;0,67; 0,70
16-23		35,0	weiß, hygroskopisch	0,53;0,67;0,70; 0,93
24-35	15% Alkohol	127,0	weiß, hygroskopisch	0,10;0,38;0,44; 0,53;0,68
36-56	20% Alkohol	193,0	weiß, hygroskopisch	0,38;0,44;0,60; 0,87;0,91
57-82	30%Alkohol	26,0	weiß, hygroskopisch	0,38;0,44;0,55; 0,60;0,65;0,76; 0,87
83-105	96% Alkohol	37,0	weiß, hygroskopisch	0,76;0,87;0,91

1.2 Reinigung der Rohfraktion an Zellulosepulver

In den aus der Kohle/Celite-Säule erhaltenen Fraktionen 57-82 war Procumbid (Rf-Wert 0,65) angereichert enthalten. Zur Abtrennung der überwiegenden Kohlenhydrat-Anteile wurden diese Rohfraktionen an Zellulosepulver verteilt.

Für je 5 g der vereinigten Fraktionen wurden 400 g Zellulosepulver S & S 123 mehrmals mit Essigester, Pyridin, Wasser und Aceton gewaschen, getrocknet und mit Pyridin/Essigester/Wasser (11:40:6) zur Säule gegossen. Die Substanz wurde darauf mit demselben Lösungsmittelgemisch aufgebracht und verteilt.

Bei dieser Trennung konnten insgesamt 3,0 g einer bräunlichen, dünnschichtchromatographisch fast einheitlichen Rohsubstanz erhalten werden. Diese wurde in Aethanol gelöst und über Aktivkohle filtriert. Der nur noch leicht gelblich gefärbte Rückstand war dünnschichtchromatographisch einheitlich, amorph und wog 2,0 g.

Die Kristallisation der Substanz gelingt durch Zugabe von Essigester zur konzentrierten aethanolischen Lösung bis zur gerade beständigen Trübung. Nach 10-12-stündigem Stehen dieser Ansätze bei Zimmertemperatur war das Kristallisat ausgefallen. Wird dieses nochmals in reinem Aethanol gelöst und die Lösung auf dem Wasserbad (Badtemperatur 25°C) zur Sirupdicke eingeengt, so fällt die Substanz in weißen rechteckigen oder kubischen Kristallen an. Die Ausbeute betrug 2,1 g. Aus den Mutterlaugen konnte noch 0,1 g kristalline Substanz gewonnen werden.

2. Reaktionen des Procumbids

2.1 Analytische Eigenschaften

Schmelzpunkt 212° C

Spez. Drehung $[\alpha]_D^{20}$ - 80,9° ± 0,7° (c = 2,805, Aethanol)

$C_{15}H_{24}O_{11}$ (380,7) Ber.: C 47,37% H 6,36 %

Gef.: C 47,74% H 6,34 %

C-Methyl-Bestimmung: 3,49% CH_3- oder 0,9 C-Methylgruppen

UV-Spektrum λ_{max} 217 nm (1g ε 2,86; Aethanol)

2.2 Reaktionen an der Doppelbindung

2.2.1 Katalytische Hydrierung

15 mg Pd/Aktivkohle wurden in 5 ml Aethanol 1/2 Stunde vorhydriert. Die zugegebene Lösung von 12,64 mg Glucosid in 3 ml Aethanol verbrauchte bis zum Stillstand der Wasserstoffaufnahme bei 751,6 Torr und 20° C 0,8 ml Wasserstoff, entsprechend 1,64 Mol. Der Katalysator wurde abfiltriert und der Ansatz dünnschichtchromatographisch geprüft. Neben dem Dihydroprodukt, Rf-Wert 0,43 (n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:2), war ein Nebenprodukt, Rf-Wert 0,34, nachzuweisen. Procumbid zeigt im gleichen Fließmittel den Rf-Wert 0,4.

Zur Darstellung der Hydrierungsprodukte wurden 120 mg Glucosid an 100 mg vorhydrierter 10%iger Pd-Aktivkohle hydriert. Nach 5-stündiger Versuchsdauer zeigte der Ansatz die erwartete Zusammensetzung. Der Katalysator wurde abfiltriert und die im Vakuum eingeengte Lösung schichtchromatographisch getrennt.

10 Platten 20 x 20 cm wurden mit je 10 g Kieselgel GF_{254} "Merck" beschichtet, an der Luft getrocknet und eine halbe Stunde bei 110°C aktiviert. Entwickelt wurde zweimal in n-Butanol/Aceton/Wasser 4:5:1. Das Dihydroprodukt zeigt in diesem Fließmittel den Rf-Wert 0,65, das Nebenprodukt den Rf-Wert 0,55.

Mit absolutem Aethanol konnten aus den abgetrennten Zonen 71 mg amorphes Dihydroprocumbid und 25 mg Nebenprodukt isoliert werden.

Das dünnschichtchromatographisch nicht einheitliche Dihydroprodukt mußte nochmals in der gleichen Weise gereinigt werden. Doch auch das schließlich einheitliche Produkt war nicht zur Kristallisation zu bringen.

2.2.2 Ozonspaltung

In die eisgekühlte Lösung von 15 mg Procumbid-Acetat in 5 ml neutralem wasserfreiem Aether wurde solange ein mäßiger Ozonstrom eingeleitet, bis das Ausgangsprodukt mit Carr-Price-Reagenz nicht mehr nachzuweisen war.

Die Lösung wurde darauf in der vorhydrierten Suspension von 15 mg 10%iger Palladium-Aktivkohle in 5 ml neutralem, wasserfreiem Essigester hydriert.

Nach der Entfernung des Katalysators wurde die Lösung vorsichtig im schwachen Vakuum eingeengt und der Rückstand mit 5 ml Eiswasser versetzt. Der dabei ausfallende Niederschlag war weiß. Er wurde abfiltriert und mit Eiswasser mehrmals gewaschen. Nach dem Umkristallisieren wurden 4,5 mg nadelförmige Kristalle erhalten, die zwischen 127-130°C schmolzen.
Das Waschwasser wurde mit dem Filtrat der Fällung vereinigt.

Nachweis des Formaldehyds

1) mit Chromotropsäure/Schwefelsäure

0,5 ml des Filtrats wurden in einem Reagenzglas mit 0,5 ml einer 0,5%igen wässrigen Chromotropsäurelösung und 4 ml Schwefelsäure (4 Teile konz. H_2SO_4/1 Teil H_2O) versetzt. Der Ansatz wurde 20 min bei 60°C gehalten und danach zur vollen Ausbildung des violettroten Farbproduktes weitere 40 min bei Zimmertemperatur stehen gelassen.

Als Blindlösung diente eine Mischung aus 0,5 ml des Filtrats, 4 ml Schwefelsäure und 0,5 ml Wasser.

Zum Vergleich wurde die Reaktion mit einer verdünnten Formaldehyd-Lösung (etwa 1:1000) durchgeführt.

2) mit fuchsinschwefliger Säure

1 ml des Filtrats wurde mit 1 ml Schwefelsäure (1 Teil konz. H_2SO_4 und 3 Teile H_2O) und 1 ml Schiff'schem Reagenz versetzt und nach gründlichem Umschütteln stehen gelassen. Nach 1/2 Stunde war eine schwache blauviolette Färbung entstanden.

3) Gaschromatographischer Nachweis

Säule :	R ; 2 m lang ∅ 3 mm
Säulentemperatur	50°C
Einspritzblock-temperatur	100°C
Trägergas	Helium
Strömungsgeschwindigkeit	25 ml/min
Detektor	FID
FID-Zuleitung	100°C
Papiervorschub	1 cm/min

Unter diesen Bedingungen zeigt Formaldehyd eine Retentionszeit von 3,25 min.

Nachweis der Ameisensäure

Zum Nachweis als Hydroxamsäure (14) wurden 5 ml des neutralisier ten Filtrats im Vakuum zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde mit 4 ml Methanol und unter Umschwenken tropfenweise mit 1,5 ml konz. Schwefelsäure versetzt. Der gebildete Ester wurde vorsichtig in eine Vor lage mit 10 ml Hydroxylamin-Lösung überdestilliert und die Reaktionslösung 20 min auf dem Wasserbad zum Sieden erhitzt.

Zur Darstellung der Vergleichsprobe wurden 10 mg wasserfreies Natriumformiat ebenso umgesetzt.

Die Entwicklung der Hydroxamsäuren erfolgte aufsteigend in n-Propanol/Ammoniumcarbonatlösung (2:1).[(Ammoniumcarbonat-Lösung: 2 Teile 10%ige Ammoniumcarbonatlösung und 1 Teil 10%iger Ammoniak).]

Das Chromatogramm wurde mit einer Mischung aus 4 ml Eisen(III)-chloridlösung DAB 6 und 35 ml Wasser besprüht. Die Hydroxamsäuren werden dabei als rotviolette Flecke sichtbar.

Die Hydroxamsäure der Ameisensäure zeigte nach 7 Stunden Laufzeit den Rf-Wert 0,3.

2.3 Reaktionen der Hydroxylgruppen

2.3.1 Acetyl-Derivate

Procumbidpentaacetat

100 mg kristallines Procumbid wurden in 5 ml absolutem Pyridin gelöst, mit 5 ml Acetanhydrid (p.a.) versetzt und 5 Tage bei 35°C stehen gelassen Die bräunliche Lösung wurde darauf in 100 ml Eiswasser gegossen. Dabei fiel sofort ein kristalliner Niederschlag aus, der abfiltriert, mehrmals mit wenig Eiswasser gewaschen und getrocknet wurde. Die dünnschichtchromatographisch einheitliche Substanz war weiß und nadelförmig kristallin. Sie wog 62 mg und schmolz bei 137-138°C (Rf-Wert 0,72; n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:2).

Das Molekulargewicht wurde osmometrisch bestimmt und ergab den Wert 580. Für das Pentaacetat $C_{25}H_{34}O_{16}$ wird 590,5 berechnet.

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20}$ - 72,5° ± 0,9° (c = 0,485; Chloroform)

UV-Spektrum λ_{max} 241 nm (lg ε 2,3; Chloroform).

Die Anzahl der Acetylgruppen konnte durch das NMR-Spektrum bestätigt werden.

Procumbidheptaacetat

40 mg des Pentaacetats wurden in der gleichen Weise nochmals acetyliert. Das Rohacetat wurde aus Aceton/Wasser umkristallisiert und ergab 21 mg eines nicht einheitlichen kristallinen Produkts.

Die wiederholte Acetylierung von 20 mg dieser Substanz mit Acetanhydrid in absolutem Pyridin während 5 Tagen bei 40°C lieferte 18 mg Kristallisat.

Schmelzpunkt : 132-133°C

Spezifische Drehung $[\alpha]_D^{20}$ - 68° ± 1,3° (c = 0,75; $CHCl_3$)

$C_{29}H_{38}O_{18}$ (674,6) Ber.: C 51,6% H 5,68 %

Gef.: C 52,55 % H 5,90 %

Acetylzahl 41,72% CH_3CO, entsprechend 6,5 Acetylgruppen.

Acetylierung der Hydrierungsprodukte des Procumbids

20 mg Dihydroprocumbid wurden in 2 ml absolutem Pyridin gelöst und mit 2 ml Acetanhydrid (p.A.) versetzt. Nach 4-tägigem Stehen bei 35°C wurde das Acetat wie üblich gefällt und aus Aceton/Wasser umkristallisiert. Die Ausbeute betrug 8,3 mg Kristallisat, das bei 137°C schmolz. Das UV-Spektrum (Chloroform) zeigt kein Maximum.

Auf dieselbe Weise wurden 10 mg des Nebenproduktes acetyliert.

Die kristallin erhaltene Substanz (14 mg) zeigte den Schmelzpunkt 141°C und wies ein ausgeprägtes Absorptionsmaximum bei 240 nm auf ($E_{1\,cm}^{0,05\%}$: 0,3; Chloroform).

2.3.2 Perjodat-Oxydation

5,1 mg Procumbid wurden in 5 ml Wasser gelöst und mit 10 ml m/10 $NaJO_4$-Lösung (Faktor: 1,010) 45 min bei Zimmertemperatur stehen gelassen.

Nach 15 min Einwirkung von 1,5 g $KHCO_3$, 1 ml 10%iger KJ-Lösung und 25 ml n/10 Na-Arsenitlösung wird mit n/10 Jodlösung zurücktitriert.

Der Verbrauch an Na-Arsenitlösung betrug 18, 48 ml.

1 ml n/10 Na-Arsenitlösung ≙ 10, 676 mg $NaJO_4$.

Daraus ergibt sich ein Verbrauch von 19, 6 mg $NaJO_4$, entsprechend 6, 1 Mol.

Bei einem zweiten Versuch wurden auf 9, 84 mg Procumbid bei 30 min Reaktionsdauer 28, 7 mg $NaJO_4$, entsprechend 5, 18 Mol, verbraucht.

2.4 Reaktionen des Aglucons

2.4.1 Isolierung

Die dünnschichtchromatographische Prüfung der bei der Kristallisation anfallenden Mutterlauge zeigte neben Procumbid und Glucose einen weiteren, nach der Behandlung mit Carr-Price-Reagenz intensiv hellblau fluoreszierenden Fleck (Rf-Wert 0, 76 in n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:2), der als Aglucon identifiziert werden konnte.

Das Gemisch wurde an Kieselgel GF_{254} "Merck" in n-Butanol/Aceton aufgetrennt. Das mit Chloroform eluierte Aglucon war ölig und unbeständig. Das sofort aufgenommene UV-Spektrum weist ein Maximum bei λ 241 nm (lg ε 2.0; Chloroform) auf.

Versuche zur fermentativen Spaltung des Glucosids

10 mg kristallines Glucosid wurden in 10 ml Wasser gelöst und gleichmäßig auf 4 Probegläser verteilt. In jedem Ansatz wurde 1 Fermentpräparat auf Wirksamkeit geprüft.

Zu Ansatz a) wurde die Anreibung von 10 mg Emulsin in 2 ml Wasser,

zu Ansatz b) die filtrierte Anschüttelung von 20 mg Fermentpulver ß-Glukosidase (Luitpold-Werk, München) in 3 ml Wasser,

zu Ansatz c) das Filtrat der Lösung von 15 mg Fermentpulver Präparat 2073 (Röhm & Haas, Darmstadt) in 2 ml Wasser und

zu Ansatz d) das Filtrat der Lösung von 15 mg Fermentpulver Präparat 2078 (Röhm & Haas, Darmstadt) in 2 ml Wasser gegeben.

Alle Proben wurden mit Toluol überschichtet und bei 35°C gehalten.

Nach 5 Tagen war die Spaltung im Ansatz c) vollständig, im Ansatz d)

nur teilweise verlaufen [x]. Die anderen Fermentpräparate zeigten auch nach 7 Tagen keine Wirkung.

Zur Darstellung des Aglucons wurde die Lösung von 150 mg Glucosid in 2 ml Wasser mit der filtrierten Lösung von 50 mg Fermentpulver 2073 in 5 ml Wasser gemischt und 4 Tage bei 35°C stehen gelassen.

Dann wurde zur Vergärung der freigesetzten Glucose eine Anschlämmung von 0,2 g Bäckerhefe in 1 ml Wasser zugefügt und der Ansatz einen weiteren Tag bei 35°C gehalten. Nach Zusatz von 0,1 g $CaCO_3$ und 10 ml Aethanol (96%) wurde die Lösung im Vakuum auf dem Wasserbad (Bad - temperatur $<$ 25°C) eingeengt. Im wässrigen Rückstand wurden die Eiweißstoffe mit 10 ml Aethanol 96% gefällt und abzentrifugiert. Die leicht orangerot gefärbte Lösung des Aglucons wurde weiterverarbeitet.

2.4.2 Hydrierungsprodukte

Die beim fermentativen Abbau des Glucosids erhaltene Lösung des Aglucons wurde auf dem Wasserbad auf 5 ml eingeengt und nach Zugabe von 50 mg 10%iger Palladium/Aktivkohle bis zum Stillstand der Wasserstoffaufnahme hydriert.

Die nach der Entfernung des Katalysators vorsichtig auf dem Wasserbad zur Trockne gebrachte Lösung ergab 103 mg einer rötlichbraunen Substanz.

Zur Auftrennung des Gemisches der Hydrierungsprodukte wurden 50 g Kieselgel "Merck" (0,05-0,2 mm) mit gereinigtem Essigester in eine Säule (ø 1,5 cm und 34 cm Länge) eingeschlemmt. Auf diese Säule wurde die Verreibung des Rückstandes mit 5 g Kieselgel (0,05-0,2 mm) gegeben und mit Essigester/Methanol 2:3 verteilt (Tabelle 5).

---

x) Präparat 2073 enthält ein Gemisch aus Pektinesterase, Pektinpolygalakturonidasen, Zellulasen und Hemizellulasen.
Präparat 2078 enthält Amylasen und Proteasen und nur wenig Zellulase

Tabelle 5

Verteilung der Hydrierungsprodukte des Aglucons an Kieselgel

Fraktion 10 ml	Trockenrückstand mg	Rf-Werte Fließmittel: n-Butanol/Eisessig/ Wasser 4:1:2
1-7	---------	----------
8	4	0, 88
9-13	14	0, 88;0, 79;0, 61
14-17	33	0, 79;0, 61;0, 48
18-23	25	0, 48;0, 40;0, 35
24-29	18	0, 35;0, 21

Die Substanz mit dem Rf-Wert 0, 61 erwies sich als Dihydroaglucon. Eine Substanz mit dem gleichen Rf-Wert wird auch bei der fermentativen Spaltung des Dihydroprocumbids erhalten.

Zur Isolierung des Dihydroaglucons wurde der Rückstand der Fraktionen 14-17 an Kieselgel GF_{254} schichtchromatographisch getrennt (Fließmittel n-Butanol/Aceton 4:5). Es wurden 11 mg einer öligen dünnschichtchromatographisch einheitlichen Substanz erhalten.

Das aus 4 mg bereitete Acetylprodukt war nicht kristallin. Der Rf-Wert liegt in n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:2 bei 0, 79. Nach der Behandlung mit Carr-Price-Reagenz fluoresziert der Fleck schwach blau.

2.4.3 Darstellung und Reaktionen des Lactons

Durch Ausschütteln des wäßrigen Rückstandes der Fraktionen 9-13 (Tabelle 5) mit Chloroform wurde die Substanz mit dem Rf-Wert 0, 88 isoliert.

Diese Verbindung bildet sich auch, wenn das in Wasser gelöste Dihydroaglucon mit Bromwasser oxydiert wird.

5 mg Dihydroaglucon wurden in 5 ml Wasser gelöst und mit 50 mg $CaCO_3$ und 5 Tropfen Bromwasser 1/4 Stunde stehen gelassen. Das Oxydationsprodukt wurde 2 x mit 10 ml Aether ausgeschüttelt, die Aetherphase 2-mal mit wenig Wasser farblos gewaschen, über geglühtem Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum vorsichtig abgezogen.

Die Reinigung erfolgte schichtchromatographisch an Kieselgel GF_{254} mit dem Laufmittel n-Butanol/Aceton/Wasser 5:4:0,5. Der Rf-Wert des Lactons lag in diesem Fall bei 0,78.

Die Eluierung des Stoffes wurde mit absolutem Tetrachlorkohlenstoff vorgenommen. Es konnten 18 mg einer leicht gelblich gefärbten ranzig riechenden Substanz gewonnen werden. Eine Reinigung durch Hochvakuumdestillation erwies sich wegen der Zersetzlichkeit der Substanz als nicht möglich.

Hydroxamsäure-Reaktion [18]

1 Tropfen der alkoholischen Lösung wurde mit 1 Tropfen einer gesättigten alkoholischen Hydroxylaminchlorhydratlösung und 1 Tropfen einer 50%igen alkoholischen Kaliumhydroxydlösung im Porzellanschiffchen bis zum Eintritt der Reaktion (Sieden) erwärmt. Der abgekühlte Rückstand wurde mit 2 Tropfen 0,5 n HCl angesäuert und mit 1 Tropfen 1%iger $FeCl_3$-Lösung versetzt. Dabei trat sofort lachsrote Färbung auf.

Lactontitration [19]

Die Substanzproben wurden in Mikrobechergläschen in der Trockenpistole bei 14 Torr und 78°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, dann in 1 ml des frisch hergestellten neutralen Aethanols gelöst und die Lösungen mit 1 ml ausgekochtem heißem Wasser verdünnt. Die Titration erfolgte sofort gegen Phenolphthalein mit n/100 NaOH.

Dabei wurden für 5,87 mg Einwaage 2,58 ml n/100 NaOH verbraucht, was einem Äquivalentgewicht von 228 und 19,8% COOH entspricht.

Der Verbrauch für 4,06 mg Substanz betrug 1,89 ml n/100 NaOH. Daraus ergibt sich ein Äquivalentgewicht von 211 und 21,2% COOH.

Die zur Kontrolle mit alkoholischer n/100 Lauge und potentiometrisch durchgeführte Titration ergab keine wesentliche Änderung des Verbrauchs.

IV INHALTSSTOFFE DES PETROLÄTHEREXTRAKTES

1 Auftrennung

1,8 kg Aluminiumoxid neutral "Merck" zur Chromatographie wurden mit Petroläther (Kp 50-70°C) in ein Glasrohr von 15 cm ∅ und 1,55 m Länge eingeschlämmt und rückstandfrei gewaschen.

51 g Extrakt wurden, in Petroläther gelöst, aufgegeben und die Inhaltsstoffe mit Petroläther und Petroläther/Äther Mischungen steigenden Gehalts eluiert. Es wurden Fraktionen zu je 200 ml aufgefangen.

2 Untersuchung des Kohlenwasserstoffgemisches

2.1 Abtrennung eines n-Alkan-Gemisches durch Kristallisation

1 g Kohlenwasserstoffe wurden in der Siedehitze in 10 ml Methanol gelöst. Beim Abkühlen fielen 0,89 g einer weißen kristallinen Substanz an. Diese wurde 3mal aus Methanol und 1mal aus Aethanol (96%) umkristallisiert. Die schließlich erhaltene kristalline Substanz wog 0,62 g und zeigte den Schmelzpunkt 65-66°C.

2.2 Isolierung von Squalen

2.2.1 Bildung eines Harnstoffadduktes

Der Rückstand der Fraktionen 11-16 (1,5 g) wurde in 50 ml Benzol gelöst und unter ständigem Rühren mit 30 ml einer gesättigten methanolischen Harnstofflösung versetzt. Es fiel sofort kristallines Addukt aus. Nach 10 Stunden hatte sich der Niederschlag vollständig abgesetzt. Er wurde abfiltriert und mehrmals mit wenig gesättigter Harnstofflösung gewaschen.

Nach der Spaltung des Addukts durch Lösen der Kristalle in heißem Wasser wurden die Kohlenwasserstoffe mit Petroläther ausgeschüttelt. Die zurückgewonnenen Kohlenwasserstoffe wogen 1,2 g.

Filtrat und Waschlösung des Addukts wurden vereinigt, mit 20 ml Wasser verdünnt und mit Petroläther ausgeschüttelt. So konnte der überschüssige Harnstoff sehr schonend abgetrennt werden.

Der unter Stickstoff im Vakuum zur Trockne gebrachte Rückstand der Petrolätherausschüttelung war ölig und wog 183 mg.

2.2.2 Abtrennung des Squalens als Thioharnstoff-Addukt

Der Rückstand wurde in 10 ml Benzol gelöst und unter Rühren mit 10 ml einer gesättigten methanolischen Thioharnstoff-Lösung versetzt. Nachdem eine feine Fällung eingetreten war, wurde noch etwa 0,1 g fein gepulverter Thioharnstoff zugefügt und der Ansatz zur vollständigen Fällung weitere 10 min gerührt.

Nach 4-tägigem Stehen unter Lichtabschluß wurde das blättrige Addukt abfiltriert. Zur Spaltung wurde es im Wasserbad solange mit 10 ml Wasser erwärmt, bis die Kristalle gelöst waren. Dabei schieden sich die Kohlenwasserstoffe als feiner Film auf der Lösung ab.

Die abgekühlte Lösung wurde mit Petroläther ausgeschüttelt und die Petrolätherlösung über geglühtem Natriumsulfat getrocknet.

Die im Wasserbad unter Stickstoff zur Trockne gebrachte Lösung lieferte 98,9 mg eines gelblichen öligen Rückstandes.

2.2.3 Versuch zur Darstellung des Squalenhexahydrochlorids

70 mg der über das Thioharnstoff-Addukt abgetrennten Substanz wurden mit 5 ml wasserfreien, chlorwasserstoffgesättigtem Aceton versetzt. In diese Mischung wurde 10 Stunden lang trockenes HCl-Gas eingeleitet. Die sich bald ausbildende Gelbfärbung schlug nach 1 Stunde in eine immer stärker werdende braune Farbe um. Es fiel jedoch kein Niederschlag aus.

2.3 Gaschromatographische Analyse der Kohlenwasserstoffe

Die gaschromatographische Untersuchung der Kohlenwasserstoffe wurde auf der SE 52 (5%)-Säule bei verschiedenen Temperaturbedingungen ausgeführt.

Säulentemperatur	240° C	260° C	200-280° C/5°/min
Einspritzblock-temperatur	325° C	275° C	350° C
Trägergas	N_2	N_2	N_2
Strömung	12 ml/min	35 ml/min	28 ml/min
Zuleitung FID	350° C	325° C	330° C
Papiergeschwindigkeit	0,5 cm/min	1 cm/min	1 cm/min

Die bei diesen verschiedenen Bedingungen sich verändernden Retentionszeiten sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

Als Vergleichssubstanzen standen die n-Alkane C 25, C 26, C 30 und C 31 zur Verfügung. Soweit die Identifizierung im Mischchromatogramm

Tabelle 6

Retentionszeiten der n-Alkane C 21 - C 32

Anzahl der C-Atome	Temperaturen		
	240° C	260° C	200-280° C
21	6, 2	2, 65	7, 7
22	8, 8	3, 2	9, 2
23	11, 0	3, 95	10, 5
24	15, 6	5, 15	12, 0
25	21, 4	6, 7	13, 5
26	27, 8	8, 75	15, 1
27	37, 9	11, 5	16, 5
28	50, 0	15, 0	18, 2
29	67, 6	19, 5	20, 1
30	89, 6	25, 1	22, 4
31	121, 3	32, 6	25, 3
32	-	42, 4	29, 3

nicht möglich war, erfolgte sie mit Hilfe der Retentionsindices (36) und dem Diagramm, das sich aus den logarithmisch gegen die C-Zahl aufgetragenen Retentionszeiten ergibt.

Zur Identifizierung des Squalens wurden folgende Bedingungen gewählt:

Säulentemperatur	240° C
Einspritzblock-temperatur	285° C
Trägergas	N_2
Strömungsgeschwindigkeit	30 ml/min
Zuleitung FID	265° C
Papiergeschwindigkeit	1 cm/min

Squalen zeigt unter diesen Bedingungen eine Retentionszeit von 26 min.

3. Die Fett- und Wachs-Fettsäuren

3.1 Darstellung der Fettsäuremethylester

Fett bzw. Wachs wurden verseift (49) und die Fettsäuren isoliert. Diese wurden mit Diazomethan methyliert.

1 g p-Tolylsulfonylmethylnitrosamid wird in 15 ml Äther gelöst. Die eisgekühlte Lösung wird mit 5 ml einer 5%igen äthanolischen Kalilauge versetzt und nach 5 Minuten das freigesetzte Diazomethan in die Lösung der Fettsäuren in Äther überdestilliert.

Nach 3-stündiger Einwirkung wird mit dem Lösungsmittel auch der Überschuß an Diazomethan abdestilliert.

3.2 Gaschromatographie der Fettsäuremethylester

Säule	EGS (s. S. 45)
Säulentemperatur	170° C
Einspritzblock-temperatur	250° C
Trägergas	N_2
Strömungsgeschwindigkeit	30 ml/min
Papiervorschub	0,5 cm/min

Zum Vergleich dienten die Methylester von Palmitinsäure, Stearinsäure, Ölsäure, Linol- und Linolensäure.

4. Untersuchung der Sterine

4.1 Isolieren des Steringemisches

Die Sterine fielen vor allem in den mit Petroläther/Äther 4:6 erhaltenen Fraktionen an. Diese erwiesen sich dünnschichtchromatographisch nur wenig verunreinigt. Die rotbraune Lösung wurde eingeengt und mit 96% Äthanol im Verhältnis 1:1 versetzt.

Nach dem Stehen über Nacht war ein leicht gelblich gefärbtes Kristallisat ausgefallen. 2-maliges Umkristallisieren aus Methanol lieferte 9,9 g einer weißen, nadelförmig kristallinen Substanz, die bei 139° C schmolz.

4.2 Nachweis-Reaktionen

a) LIEBERMANN-BURCHARD-Reaktion (44)

Ein Kristall der Substanz wird in 0,5 ml Chloroform gelöst und mit 0,5 ml Acetanhydrid und 2 Tropfen Schwefelsäure versetzt. Es wird der Farbübergang von violett über blau nach dunkelgrün beobachtet.

b) TORTELLI-JAFFE-Reaktion (45)

10 mg des Sterins werden in 1 ml Essigsäure gelöst. Diese Lösung wird vorsichtig mit einer 2%igen Lösung von Brom in Chloroform unterschichtet. Δ 7 und Δ 8-Stenole und ihre Acetate geben nach kurzer Zeit an der Grenzschicht einen grünen Ring.

4.3 Acetylierung der Sterine

500 mg Sterin werden mit 10 ml Acetanhydrid 10 min am Rückfluß gekocht. Die noch warme Lösung wird mit der doppelten Menge Aethanol/Wasser 1:1 versetzt.

Das nach dem Abkühlen ausgefallene Kristallisat wird abfiltriert, mit Aethanol/Wasser 1:1 mehrmals gewaschen und aus Äther/Methanol umkristallisiert. Das Sterinacetat schmolz bei 118-119° C.

4.4 Darstellung eines Bromaddukts (50)

200 mg Sterinacetat werden in 1 ml Äther gelöst und mit 1 ml einer 5%igen Lösung von Brom in Eisessig versetzt. Nach 2-stündiger Einwirkung wird das Reaktionsgemisch 1/2 Stunde in ein Kühlbad (- 10° C) gebracht. Dabei fallen die Tetrabromide der Δ 5,22-Diene Stigmasterin und Brassicasterin als blättriges Kristallisat aus, während die Bromanlagerungsprodukte der einfach ungesättigten Sterine in Lösung bleiben.

Das abfiltrierte Kristallisat wog 27 mg. Es schmolz nach dem Umkristallisieren aus Äther/Eisessig im Bereich von 206-210° C.

4.5 Dünnschichtchromatographie der Sterinacetate auf Silbernitrat-Kieselgel (47)

Die Sterinacetate werden in gleicher Konzentration und Menge auf silbernitrat-imprägnierte Kieselgel-G-Schichten aufgetragen. Die mit Filtierpapier ausgekleidete Trennkammer wird 18 Stunden mit dem Fließmittel Petroläther/Chloroform/Eisessig (75:25:0,5) gesättigt.

Die Platten werden mit der Lösung von Antimon(III)/Antimon(V)-chlorid in Chloroform (alkohol- und wasserfrei) besprüht. Nach dem Erhitzen (10 min auf 120° C) zeigen die Sterinacetate blaßgelb fluoreszierende Flecke.

4.6 Gaschromatographie der Sterine

a) Untersuchung der Sterinacetate

Säule	SE 52 5% (s.S. 45)	Trägergas	N_2
Säulentemperatur	250° C	Strömungsgeschwindigkeit	40 ml/min
Einspritzblocktemperatur	300° C	Papiergeschwindigkeit	1 cm/min
Detektorzuleitung	330° C		

b) Gaschromatographie der Trimethylsilyläther (52)

25 mg Sterin werden in einem 2 ml-Schliff Reagenzglas in 1 ml wasserfreiem Pyridin gelöst und mit 0,1 ml Hexamethyldisilazan und 1 Tropfen Trimethylchlorsilan versetzt. Nach dem Umschütteln wird sofort gaschromatographiert.

Säule	SE 30 (1%) (s.S. 45)
Säulentemperatur	250° C
Einspritzblocktemperatur	300° C
Trägergas	N_2
Strömungsgeschwindigkeit	35 ml/min
Zuleitung FID	345° C
Papiergeschwindigkeit	1 cm/min

4.7 Quantitative Bestimmung der Sterine

Die mengenmäßige Zusammensetzung des Steringemisches ergab sich aus dem Gaschromatogramm der Trimethylsilyläther. Es wurde nach der Methode "Höhe mal Gesamtretentionszeit" ausgewertet, die nach R. KAISER (42) auch bei mangelhaft getrennten Peaks noch reproduzierbare Werte liefern soll. Eine Verbesserung der Genauigkeit der so erhaltenen Näherungswerte wurde durch Vergleich mit einem Steringemisch bekannter Zusammensetzung und nach dem von A. ROZANSKI (53) angegebenen Verfahren versucht.

D LITERATURVERZEICHNIS

1. PHILLIPS, E.P.: The Weeds of South Africa Government Printer, Pretoria (1938)

2. VOLK, O.H.: Dtsch. Apotheker-Ztg. 104, 573 (1964)

3. WATT, J.M. und M.BREYER-BRANDWIJK: Medicinal and poisonous plants of southern and eastern Africa Edinburgh (1962)

4. ZORN, B.: Rheumaforschung 17, 134 (1958)

5. Privat-Mitteilung Dr. G.Albus, Köln (Fa. Madaus und Co)

6. TUNMANN, P. und R.LUX: Dtsch. Apotheker-Ztg. 102, 1274 (1962)

7. TUNMANN, P. und N.STIERSTORFER: Dtsch. Apotheker-Ztg. 103, 395 (1963)

8. LICHTI, H. und A.v.WARTBURG: Tetrahedron Letters (London), 1964 835-843
Helv. chim. Acta 49, 1552 (1966)

9. TUNMANN, P. und N.STIERSTORFER: Tetrahedron Letters (London), 1964, 1697-1699

10. LUX, R.: Über ein Glukosid der Wurzel von Harpagophytum procumbens DC. Dissertation Würzburg (1960)

11. STIERSTORFER, N.: Ein Beitrag zur Kenntnis der Inhaltsstoffe von Harpagophytum procumbens DC. Dissertation Würzburg (1961)

12. WHISTLER, R.L. und D.DURSO: J.Amer. chem. Soc. 72, 677 (1950)

13. BRIGGS, L.H., B.F.CAIN, P.W.LE QUESNE, J.SHOOLERY: Tetrahedron Letters (London), 1963, 69-74

14. WALDI, D.: Chromatographie Verlag E.Merck A.G., Darmstadt 2.Auflage S.94

15. JACKSON, E.: Organic Reactions Band II (1943) 341-375

16. RASMUSSEN, R.S. und R.R.BRATTAIN: J.Amer.chem.Soc. 71, 1073 (1949)

17. FEIGL, F.: Tüpfelanalyse, II.Band Organischer Teil, Akadem.Verlagsgesellschaft Frankfurt (1960) S.245

18. PREGL, F. und H.ROTH: Quantitative Mikroanalyse Springer-Verlag Wien (1963)

19. SCOTT, A.J.: Interpretation of the UV-Spectra of Natural Compounds, Pergamon-Press London, Paris, Oxford 1964

20. VAN DER VEEN, J.M.: J.org.Chemistry 28, 564 (1963)

21. JACKMAN, L.M.: Applications of NMR-Spectroscopy in Organic Chemistry, Pergamon-Press London, Oxford, New York, Paris S.55

22. LEMIEUX, R.U., R.K.KULLNIG, H.J.BERNSTEIN, W.G.SCHNEIDER: J.Amer.chem.Soc. 80, 6098 (1958)

23. ARNDT, O.: Liebigs Ann.Chem. 695, 176-183 (1966)

24. ZÜRCHER, R.F.: Helv.chim.Acta 46, 2054 (1963)

25. SUHR, H.: Anwendungen der kernmagnetischen Resonanz in der organischen Chemie Springer-Verlag, Berlin (1965)

26. BHACCA, N.S. und D.H.WILLIAMS: Applications of NMR-Spectroscopy in Organic Chemistry Holden-Day, Inc., San Francisco (1964)

27. ZÜRCHER, R.F.: Helv.chim.Acta 44, 1380 (1961)

28. DJERASSI, C., T.NAKANO, A.N.JAMES, L.H.ZALKOW, E.J.EISENBRAUN und J.N.SHOOLERY: J.org.Chemistry 26, 1192 (1961)

29. WOLINSKY, J., K. SHETH und E. RAMSTAD:	Tetrahedron Letters (London), 1961 394-397
30. INOUYE, H., T. ARAI und Y. MIYOSHI	Chem. Pharm. Bull. Jap. 12, 888-901 (1964)
31. SCHMID, H., W. HAEGELE und F. KAPLAN:	Tetrahedron Letters (London), 1961 110-118
32. BOBBITT, J. M., D. W. SPIGGLE, S. MAHBOB, H. SCHMID und W. v. PHILIPSBORN:	J. org. Chemistry 31, 500 (1966)
33. GEISSMAN, T. A., W. F. KNAACK, jr. und J. O. KNIGHT:	Tetrahedron Letters (London), 1966 1245-1249
34. YEOWELL, D. A. und H. SCHMID:	Experientia 20, 250 (1964)
35. ALBERS-SCHÖNBERG, G. und H. SCHMID:	Helv. chim. Acta 44, 1447 (1961)
36. KOVATS, E.:	Helv. chim. Acta 41, 1915 (1958)
WEHRLI, E. und E. KOVATS:	Helv. chim. Acta 42, 2709 (1959)
37. SCHLENK, jr., W.:	Liebigs Ann. Chem. 565, 204 (1949)
38. ISLER, O., R. RÜEGG, H. WAGNER und K. BERNHARD:	Helv. chim. Acta 39, 897 (1956)
39. BRIESKORN, C. H. und K. ZIMMERMANN:	Experientia XXI, 385 (1965)
40. HEILBRON, I. M., E. D. KAMM und W. M. OWENS	J. chem. Soc. (London), 1926, 1630
41. TÄUFEL, K. und W. HEIMANN:	Biochem. Z. 306, 123 (1940)
42. KAISER, R.:	Chromatographie in der Gasphase, Vierter Teil Bibliographisches Institut Mannheim (1965)

43. BRENNER, N., PH. SCHOLLY und L. O'BRIEN: Perkin-Elmer-Mitteilungen 2 GC, 19 (1959) 9 GC, IBF 11 d Überlingen/Bodensee

44. LIEBERMANN, C.: Ber. dtsch. chem. Ges. 18, 1803 (1885)

BURCHARD, H.: Beitrag zur Kenntnis des Cholesterins Dissertation Rostock 1889

45. TORTELLI, M. und E. JAFFE: Chemiker Ztg. 39, 14 (1915)

46. JONES, R. N.: J. Amer. chem. Soc. 72, 5322 (1950)

47. COPIUS-PEEREBOOM, J. und I. W. BEEKES: J. Chromatogr. (Amsterdam), 17, 99 (1965)

48. VAND DEN HEUVEL, H. G., C. C. SWEELEY und H. G. HORNING: J. Amer. chem. Soc. 82, (1960) 3481

49. DGF-Einheitsmethoden Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft m. b. H. Stuttgart 1950-1961 C III (53), M V 5 (57)

50. WINDAUS, A. und A. HAUTH: Ber. dtsch. chem. Ges. 39, 4378 (1906)

51. KNIGHTS, B. A.: J. Gas-Chromatogr. 2, 160 (1964)

52. SWEELEY, C. C., R. BENTLEY, M. MAKITA, W. WELLS: J. Amer. chem. Soc. 85, 2497 (1963)

53. ROZANSKI, A.: Analytic. Chem. 38, 36 (1966)

LEBENSLAUF

Am 31.10.1935 wurde ich, Hans-Eberhard Hammer, als Sohn des 1954 verstorbenen Augenarztes Dr.med. Curt Hammer und seiner Ehefrau Else, geb. Steiner, in Stettin geboren.

Die Grundschule besuchte ich seit Frühjahr 1942 in Stettin, dann, nach zeitweiliger Unterbrechung infolge Evakuierung und Flucht, ab Dezember 1945 in Heilbronn.

Ende 1946 trat ich in Heilbronn in die Vereinigten Oberschulen für Jungen ein. Dort bestand ich am Theodor-Heuß-Gymnasium im Frühjahr 1956 die Reifeprüfung.

Nach der zweijährigen Praktikantenzeit in der Rathaus-Apotheke in Mosbach/Baden legte ich am 28.3.1958 in Karlsruhe die Pharmazeutische Vorprüfung ab.

Im Sommersemester 1958 begann ich an der T.H.Karlsruhe das Studium der Pharmazie. Am 9.3.1961 bestand ich dort die Pharmazeutische Prüfung.

Von Mai bis November 1961 war ich als Kandidat in der Stadt-Apotheke Kornwestheim tätig.

Die Bestallung als Apotheker erhielt ich mit Wirkung vom 30.4.1962.

Zum Wintersemester 1961/62 nahm ich an der Universität Würzburg das Studium der Lebensmittelchemie auf, das am 29.4.1963 mit dem Bestehen der Hauptprüfung abgeschlossen wurde.

Nach einer längeren Apothekenvertretung begann ich im November 1963 am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg die vorliegende Arbeit. Diese stand unter der Leitung von Herrn Professor Dr. P. Tunmann.

Ich habe mich bei keiner anderen Fakultät um den Doktorgrad beworben.

OFFSETDRUCK GUGEL
87 Würzburg Burkarderstr. 9

OFFSETDRUCK GUGEL
87 Würzburg Burkarderstr. 9